

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. P. C. Weber

**Regulation podosomaler Adhäsionen in
primären humanen Makrophagen
durch p21-activated kinase (PAK)-
abhängige Signalwege**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alexandra Gringel
aus
München

2009

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. P. C. Weber

**Regulation podosomaler Adhäsionen in
primären humanen Makrophagen
durch p21-activated kinase (PAK)-
abhängige Signalwege**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alexandra Gringel
aus
München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Stefan Linder

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Georg Enders
Prof. Dr. Thomas Heinzeller

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2009

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

Ort, Datum

Alexandra Gringel

Für meine Familie

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde von April 2004 bis Oktober 2006 am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauferkrankungen der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Anleitung von PD Dr. Stefan Linder erstellt.

Die Arbeit wurde teilweise im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der LMU München (FöFoLe, Promotionsstudium „Molekulare Medizin“) durch Drittmittel unterstützt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Artikel:

Gringel, A., Walz, D., Rosenberger, G., Minden, A., Kutsche, K., Kopp, P., Linder, S.
 „PAK4 and α -PIX determine podosome size and number in macrophages through localized actin regulation”
 J Cell Physiol. 2006 Nov; 209(2):568-79.

Tagungsbeiträge mit gedruckten abstracts:

Gringel, A., Walz, D., Kutsche, K., Rosenberger, G., Minden, A., Kopp, P., Linder, S.
 “PAK4 and α -PIX regulate podosome size and number in macrophages”
Adhesion meeting 2005, Munich, April 28-30, Germany

Gringel, A., Walz, D., Kutsche, K., Rosenberger, G., Minden, A., Kopp, P., Linder, S.
 “PAK4 and α -PIX regulate podosome size and number in macrophages”
ASCB meeting 2005, San Francisco, December 10-14, USA

Gringel, A., Walz, D., Kutsche, K., Rosenberger, G., Minden, A., Kopp, P., Linder, S.
 “PAK4 and α -PIX regulate podosome size and number in macrophages”
German Society for Cell Biology (DGZ) annual meeting 2006, Braunschweig, March 29-April 1, Germany

Vortrag:

“PAK4 und α -PIX regulieren Podosomen-Anzahl und -Größe in primären humanen Makrophagen“
Statusseminar des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ der Medizinischen Fakultät der LMU München; Herrsching, 20.Mai 2006

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	13
1.1	Makrophagen	13
1.2	Zytoskelett	15
1.2.1	Aktinzytoskelett	16
1.2.1.1	Aktindynamik	16
1.2.1.2	Dendritic Nucleation Modell	17
1.2.1.3	Regulation durch RhoGTPasen	19
1.2.2	Podosomen	21
1.2.2.1	Aufbau	22
1.2.2.2	Podosomenbildung und -dynamik	23
1.2.2.3	Podosomen-Regulation	24
1.2.2.4	Funktion	25
1.3	ADF/Cofilin	26
1.3.1	Funktion	26
1.3.2	Regulation	28
1.4	PAK (p21-activated Kinase)	31
1.4.1	Allgemeines	31
1.4.2	Aufbau	33
1.4.3	Regulation	34
1.4.3.1	Autoinhibition	34
1.4.3.2	GTPase-abhängige Regulation	35
1.4.3.3	GTPase-unabhängige Regulation	35
1.4.4	PAK1 und PAK4 im Vergleich	36
1.4.5	Funktion	37
1.5	PIX (PAK-interactive exchange factor)	40
1.5.1	Allgemeines	40
1.5.2	Aufbau	40
1.5.3	Funktion	42
1.6	GIT (G protein-coupled receptor kinase interactor)	43
1.7	PAK-PIX Interaktion und PAK-PIX-GIT Komplex	44
1.8	Medizinische Relevanz podosomaler Strukturen und ihrer Regulatoren in Makrophagen ..	45
1.9	Fragestellung	48
2	MATERIAL UND METHODEN	50
2.1	Zellbiologische Methoden	50
2.1.1	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	50
	Allgemeines	50
	Kultivierung von <i>E. coli</i>	50
2.1.2	Transformation von Plasmiden	51
2.1.2.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli DH5α</i>	51
2.1.2.2	Transformation mittels Elektroporation	51
2.1.2.3	Herstellung hitzekompenter Bakterien	51
2.1.2.4	Hitzeschocktransformation	52
2.1.3	Arbeiten mit primären menschlichen Zellen	52
2.1.3.1	Allgemeines	52
2.1.3.2	Isolation primärer humaner Makrophagen aus menschlichem Blut	52

2.1.3.3 Isolierung menschlicher Endothelzellen aus der Nabelschnur.....	54
2.1.4 Ablösung adhärenter Zellen	55
2.1.5 Transfektion von Zellen	55
2.2 Molekularbiologische Methoden	55
2.2.1 DNA-Präparation	55
2.2.1.1 Plasmide	55
2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese.....	56
2.2.1.3 Plasmidisolierung.....	57
2.2.1.4 Gelelution.....	57
2.2.2 DNA Restriktionsverdau	57
2.2.2.1 analytisch.....	57
2.2.2.3 präparativ.....	57
2.2.3 Ligation	57
2.2.3.1 Allgemein	57
2.2.3.2 Präparation des Zielvektors.....	58
2.2.3.3 Präparation der DNA Fragmente.....	58
2.2.3.4 Klonierung mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide	59
2.2.3.5 Ligation	60
2.2.3.5 Transformation in Zellen.....	61
2.2.3.6 Bakterien-PCR (Kolonie-PCR)	61
2.2.4 RNA-Interferenz (RNAi).....	61
2.2.5 DNA <i>micro array</i>	63
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	63
2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	63
2.3.2 Western Blot.....	63
2.3.2.1 Puffer und Lösungen	63
2.3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	65
2.3.2.3 Blotting.....	65
2.3.2.4 Detektion.....	65
2.3.2.5 Molekulargewichtsbestimmung	66
2.3.3 Interaktionsstudien	66
2.3.3.1 Vorbemerkung	66
2.3.3.2 Herstellung von Zelllysaten aus humanen Zellen.....	66
2.3.3.3 Differentielle Lyse	66
2.3.3.4 Immunpräzipitation	67
2.4 Immunfluoreszenz und Mikroskopie	68
2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz	68
2.4.1.1 Fixierung und Lyse von Zellen.....	68
2.4.1.2 Färbung mit spezifischen Antikörpern	69
2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie und Bildverarbeitung	70
3 ERGEBNISSE	71
3.1 Zielsetzung der Arbeit.....	71
3.2 Bedeutung von Cofilin für die Podosomen-Regulation	71
3.2.1 Auswirkungen der Cofilin-Überexpression auf primäre humane Makrophagen	72
3.2.2 Überexpression von Cofilin-Mutanten und deren Auswirkungen auf primäre humane Makrophagen.....	72
3.3 Bedeutung von PAK für die Podosomen-Bildung	76
3.3.1 PAK4 als physiologischer Podosomen-Regulator in primären humanen Makrophagen	76
3.3.2 Transfektion mit PAK4 shRNA führt zu einer Verminderung der Podosomenanzahl	79
3.3.3 Überexpression von PAK4 in primären humanen Makrophagen.....	82
3.3.4 Überexpression von PAK4-Mutanten in primären humanen Makrophagen	84
3.3.5 Einfluß der PAK4 Kinase Domäne auf die Podosomen-Bildung.....	88

3.4	Bedeutung von αPIX für die Podosomen-Bildung.....	92
3.4.1	α PIX Lokalisation in primären humanen Makrophagen.....	92
3.4.2	α PIX Überexpression in primären humanen Makrophagen.....	93
3.4.3	Überexpression von α PIX-Mutanten in primären humanen Makrophagen.....	95
3.5	GIT1.....	102
3.6	PAK4-αPIX Interaktionsstudien	103
4	DISKUSSION.....	105
4.1	Bedeutung von Cofilin für die Podosomen-Regulation	105
4.2	Bedeutung von PAK4 für die Podosomen-Bildung	105
4.3	Bedeutung von α -PIX für die Podosomen-Bildung	105
4.4	GIT1.....	105
4.5	Interaktionsstudien	105
4.5.1	PAK4- α -PIX Interaktion.....	105
4.5.2	α -PIX-GIT1 Interaktion.....	105
4.5.3	PAK4-GIT1 Interaktion.....	105
4.6	Modell der Podosomenregulation in Makrophagen	105
5	AUSBLICK	105
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	105
7	LITERATUR.....	105
8	DANKSAGUNG	105
9	LEBENS LAUF	105

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ADF	actin depolymerizing factor
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP-PNP	Adenosin-5(β , γ -imido)-triphosphat
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EtOH	Ethanol
F	Farad
F-	filamentöses (Aktin)
FAK	Fokale Adhäsionen-Kinase (<i>focal adhesion kinase</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec)
g	Gramm
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GIT1	<i>G-protein-coupled receptor kinase interacting protein target 1</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HeLa	Epithelzellen des Zervixkarzinoms (Helen Lane)
HRP	<i>horseraddish peroxidase</i>
HUVEC	Humane vaskuläre Endothelzellen aus Nabelschnüren (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
I.E.	internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
K	Kilo
l	Liter
LB	Luria Broth
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
max.	maximal
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i>
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
MPS	mononukleäres Phagozytose System
mRFP	monomeres rotes fluoreszierendes Protein
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
NGS	Normales Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)
NHS	Normales Humanserum (<i>normal human serum</i>)
nm	Nanometer
NPF	<i>nucleation promoting factor</i>
Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	<i>p21-activated Kinase</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS/BSA	PBS + 0,5% BSA
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	platelet-derived growth factor
P _i	anorganisches Phosphat
Pyk	Prolin-reiche Tyrosin Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIX	<i>PAK-interacting exchange factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> , RPMI 1640 ist ein Standardzellkulturmedium
RPMI*	RPMI Medium mit 100µg/ml Penicillin/Streptavidin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfat</i>)
sec	Sekunden
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Taq	termus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS + Tween [®] 20
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	<i>unit(s)</i>
u.a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
v.a.	vor allem
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
Vol	Volumina
W	Watt
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrome-Protein
WAVE	WASP-Family Verprolin Homologous Protein
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des Immunsystems und gehören als mononukleäre Leukozyten der Gruppe des mononukleären Phagozytose Systems (MPS) an. Ihre Aufgaben liegen in den Gebieten der spezifischen/erworbenen wie auch der unspezifischen/angeborenen Immunabwehr.

Die Makrophagen entstammen, ebenso wie die neutrophilen Granulozyten, der myeloiden Stammzellreihe. Sie entwickeln sich ausgehend von multipotenten myeloiden Stammzellen über Monoblasten und Promonozyten in Monozyten, die letztendlich das Knochenmark verlassen. Die Monozyten zirkulieren 1-2 Tage im Blutgefäßsystem, bevor sie in die verschiedenen Gewebe einwandern und sich dort zu gewebespezifischen ortsständigen Makrophagen differenzieren, die je nach Gewebe verschiedene Namen tragen (s. Abb. 1-1).

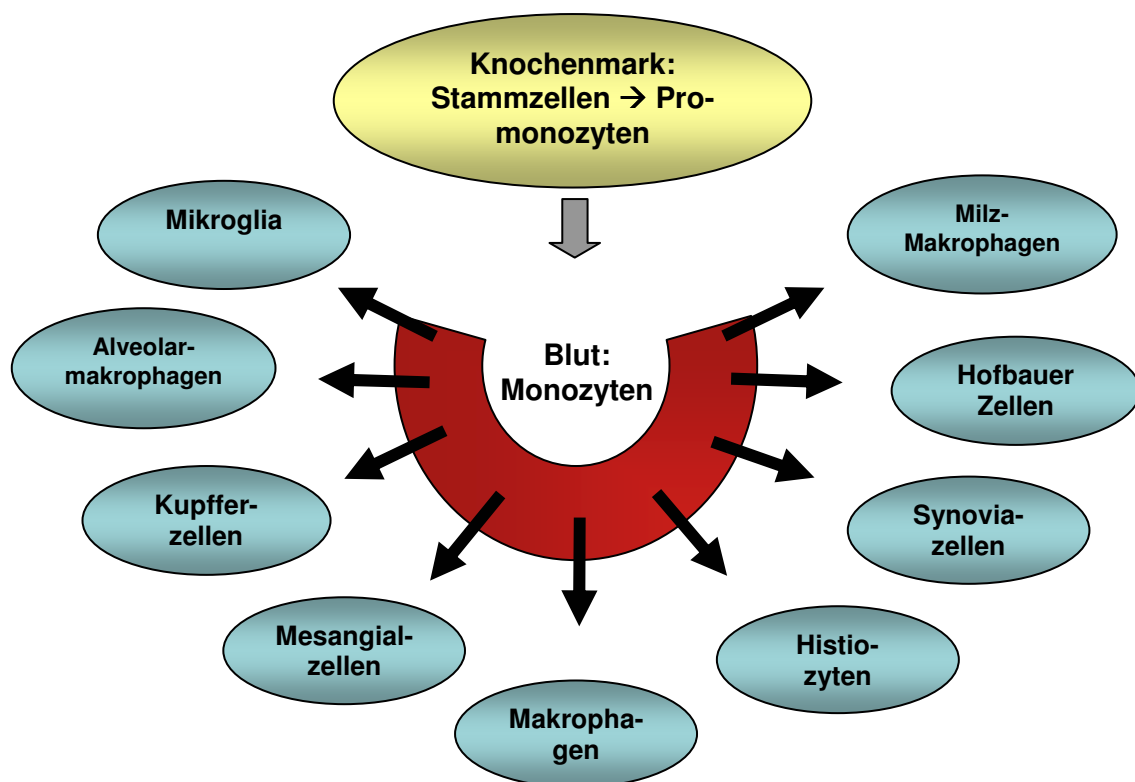


Abb. 1-1: Differenzierung der Promonozyten in verschiedene Zellen des mononukleären Phagozytose Systems (MPS).

Makrophagen erfüllen hinsichtlich der angeborenen wie auch der erworbenen Immunität wichtige Aufgaben. Im Rahmen der angeborenen Immunität können die Phagozyten

mittels Oberflächenrezeptoren, wie z.B. scavenger-Rezeptoren oder toll-like-Rezeptoren, Glykolipide, Proteolipide und Proteine erkennen (Greenberg and Grinstein, 2002; Underhill and Ozinsky, 2002; Akira et al., 2003; Aderem et al., 1999). Aber auch an der erworbenen Immunantwort sind Makrophagen wesentlich beteiligt. Die über Phagozytose aufgenommenen Bakterien werden prozessiert und an oberflächlichen MHC II Rezeptoren gebunden den T-Lymphozyten präsentiert. Auch apoptotische körpereigene Zellen, Zelldebris und entartete Zellen werden durch Makrophagen phagozytiert und ohne Entzündungsreaktion beseitigt. Somit tragen Makrophagen auch entscheidend zur Gewebemöostase bei (Platt et al, 1998; Killion et al., 1994).

Um an den Entzündungsort zu gelangen, können Monozyten an aktivierte Endothelzellen adhären und das Gefäßsystem parazellulär durch Interzellulärspalten, aber auch auf dem transzellulären Weg verlassen (s. Abb. 1-2; Johnson-Leger et al., 2000; Muller et al., 2003; Molteni et al., 2006). Dieser Vorgang wird auch Diapedese genannt (Übersicht bei Petri et al., 2006). Im Gewebe migrieren sie, angezogen von bakteriellen Substanzen wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) oder körpereigenen Zytokinen und Chemokinen, auf den Entzündungsherd zu (Raetz et al., 1993; Jones et al., 2000). Vor Ort können sie dann Mikroorganismen phagozytieren, prozessieren und gebunden an oberflächliche MHC-II Rezeptoren T-Lymphozyten präsentieren.

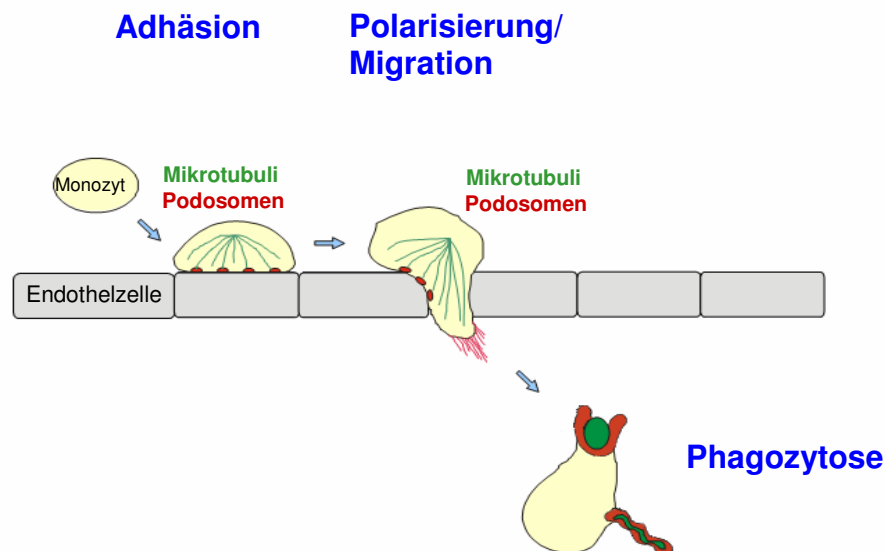


Abb. 1-2: Monozytendiapedese durch das Endothel in Einzelschritten

Makrophagen produzieren eine Vielzahl von sekretorischen Substanzen. Diese umfassen Plasmaproteine (Koagulations- und Komplementfaktoren), Zytokine und

Wachstumsfaktoren (Il-1, $\text{TNF}\alpha$, PDGF), Sauerstoff- und Stickstoff-Metabolite (H_2O_2 , NO, NO_2), Arachidonsäurederivate, Matrixproteine, Enzyme und Enzyminhibitoren.

Reife Makrophagen erreichen einen Durchmesser von ca. 15-80 μm , sie besitzen reichlich basophiles Zytoplasma mit feiner eosinophiler Granulation, welches zahlreiche endozytotische Vesikel und Lysosome enthält. Der Kern erscheint klein und eingebuchtet (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 2002).

Genetische Defekte können zu einer Funktionseinschränkung der Makrophagen führen. Es resultieren schwere Immundefekte, aber auch inadäquate oder überschießende Immunreaktionen können die Folge sein (Fischer et al., 2001). Hier sind v.a. Krankheiten wie Asthma, Psoriasis, Arthritis und Multiple Sklerose zu nennen (Rollins et al., 1996; Worthylake and Burridge, 2001). Makrophagen nehmen auch hinsichtlich der Arterioskleroseentstehung eine entscheidende Rolle ein. So kommen sie als Schaumzellen in der Intima bereits im frühen Stadium der Krankheit vor (Aqel et al., 1984). Aber auch die von Makrophagen produzierten Metalloproteasen, Sauerstoffradikale und Zytokine spielen eine wichtige Rolle im Rahmen einer Plaqueruptur mit anschließenden thromb-embolischen Ereignissen (Shah et al., 1995; Fabunmi et al., 1998; Rajavashisth et al., 1999; Hegyi et al., 2001; Martinet et al., 2006; Schrijvers et al., 2007).

Neueste Publikationen weisen auf eine Rolle der Makrophagen als Wegbereiter der Tumorinvasivität hin. In diesem Rahmen sollen sie durch Förderung der Angiogenese, des extrazellulären Matrixabbaus und durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren das Tumorzellwachstum bzw. die Metastasierung anregen. (Condeelis and Pollard, 2006; Yamaguchi et al., 2006)

1.2 Zytoskelett

Für all die im vorherigen Abschnitt genannten Funktionen - Adhäsion, Migration und Phagozytose sind vielgestaltige Veränderungen der Zellform notwendig. Diese wird durch einen permanenten, streng kontrollierten Umbau des Zytoskeletts bewerkstelligt.

Eukaryotischen Zellen besitzen ein Zytoskelett welches aus drei Hauptbestandteilen besteht: Aktinfilamente, welche für Kontraktilität und Zellprotrusion verantwortlich sind, Mikrotubuli, ein polarisiertes Transportnetzwerk für Proteine und Intermediärfilamente mit vorrangiger Stützfunktion. Allen drei Anteilen ist gemein, dass es sich hier um

hochdynamische, fein regulierte Strukturen handelt, die einem ständigen *turnover* (Auf- und Abbau) unterliegen.

1.2.1 Aktinzytoskelett

Aktin ist mit einem Anteil von ca. 5% der häufigste Vertreter des Gesamtproteins einer Zelle (Kabsch and Vandekerckhove, 1992). Es liegt zunächst als Monomer mit einer molekularen Masse von 43 kDa vor. Durch Polymerisierung und Filamentbildung entstehen letztendlich zwei gegenläufig/antiparallel verdrehte Stränge, die eine Doppelhelix – das Aktinfilament - bilden (Hanson et al., 1964).

1.2.1.1 Aktindynamik

Der Großteil des zellulären Aktins liegt in monomerer Form als G-(globuläres) Aktin vor. Nur ein kleiner Teil ist als F-(filamentöses) Aktin Bestandteil des polymerisierten Filamentnetzwerkes.

Die Bildung von Aktin-Di- und -Trimeren, auch Nukleation genannt, geht langsam von statten, da dieses Stadium energetisch unvorteilhaft ist (Pollard et al., 1984). Die folgende Aktinmonomer-Addition an ein bereits bestehendes Filament (Elongation) ist für die Zelle energetisch günstiger und läuft auch deutlich schneller ab. Es entsteht ein polares Aktinfilament, da alle eingebauten Aktinmonomere die gleiche Richtung aufweisen. Demnach werden die Enden des Aktinfilaments unterschiedlich bezeichnet: als plus-Ende oder auch *barbed end* und als minus-Ende (*pointed end*). Der Aktinauf- und -abbau findet an beiden Enden statt, jedoch wächst das Filament am plus-Ende 10-fach schneller, wohingegen der Abbau eher am minus-Ende stattfindet (Pollard et al. 1986; Kuhn and Pollard, 2005; Lorenz et al., 2004).

Am *barbed end* werden vornehmlich ATP-Aktinmonomere angelagert. Diese Aktinmonomere binden zusammen mit Mg^{2+} Ionen ATP. Bei der Anlagerung an das Filament kommt es verzögert zur Hydrolyse des Nukleotids, wobei P_i und ADP zunächst eng am neugebildeten Filament gebunden bleiben. Es wird angenommen, dass die zeitlich verzögerte P_i Dissoziation (als Indikator der Filamentalterung) den Aktinabbau am *pointed end* auslöst und so zur Stabilität des Aktinfilaments beiträgt.

Die verzögerte ATP Hydrolyse und Abdiffusion des P_i scheinen auch wichtig für die Filamentstabilität und -dynamik zu sein, da terminales ADP-Aktin im Bedarfsfall schnell zu Monomeren depolymerisiert werden kann und so nach erneuter ATP Bindung wieder dem Filamentwachstum zur Verfügung steht (Pollard et al. 1984; Carlier et al., 1989). Dieser Mechanismus, der Anbau von Aktinmonomeren am *barbed end* und deren Abspaltung am *pointed end*, wird auch *treadmilling* genannt (Pollard et al., 1984).

Wie schon vorher erwähnt, findet die spontane Nukleation von Aktinfilamenten sehr selten statt, da die Bildung von Aktin-Di- und -Trimeren energetisch äußerst ungünstig ist.

Prinzipiell sind deshalb drei Wege des Aktinfilamentwachstums denkbar, die diesen Zustand umgehen (Higgs and Pollard, 1999):

1. *uncapping* der vorhandenen *barbed ends* (Hartwig et al., 1995): Um das ständige Aktinfilamentwachstum am *barbed end* zu vermeiden, werden diese durch sog. *capping*-Proteine bedeckt. Diese Proteine können bei Aktivierung der Zelle entfernt werden, und neues Filamentwachstum beginnt. Zu den *capping*-Proteinen zählen das ubiquitär vorkommende *heterodimeric capping protein* (Cooper and Schafer, 2000), Gelsolin (Harris et al., 1984; Sun et al., 1999) und Aip1 (Rodal et al., 1999; Ono et al., 2004; Okada et al., 2006).
2. Die Trennung (*severing*) von bereits bestehenden Filamenten generiert neue freie Enden, an welchen weiteres Wachstum erfolgen kann (Chan et al., 2000). Proteine, die Aktinfilamente trennen können sind u.a. Cofilin, Severin, Villin, Actophorin, Scinderin und Gelsolin.
3. *de novo* Nukleation neuer Filamente durch Aktin-bindende Proteine wie z.B. Arp2/3 Komplex (Pollard et al., 2000), Formine (Evangelista et al., 2003) oder die Initiation der Aktinnukleation durch ein erst kürzlich entdecktes Protein namens spire (Quinlan et al., 2005). Der dominierende Mechanismus der Aktingenerierung am leading edge scheint durch Arp2/3 Komplex vermittelt zu sein und ist auch unter dem Namen *dendritic nucleation model* bekannt (Pollard et al., 2000).

1.2.1.2 Dendritic Nucleation Modell

Dieses 1998 von Mullins postulierte Modell wurde 2000 durch Pollard erweitert (Mullins et al., 1998; Pollard et al., 2000). Es beschreibt die Entstehung eines verzweigten Aktinnetzwerks und den Recyclingmechanismus der Aktinmonomere (s. Abb. 1-3).

Jede Zelle enthält einen Pool an unpolymerisierten Aktinmonomeren, welche im Bedarfsfall zur Generierung von Aktinfilamenten benutzt werden können. Diese Aktinmonomere sind an Profilin und Sequestermoleküle, wie z.B. Thymosin- β 4, gebunden, so dass sie nicht am gewöhnlichen Aktinumsatz des *steady state* teilnehmen, sondern als stille Reserve fungieren. Externe Stimuli, wie z.B. Chemokine, können über die Aktivierung von Rezeptoren Signalketten in Gang setzen. So werden über RhoGTPasen und PIP2 sog. *nucleation promoting factors* (NPFs) wie z.B. WASP/N-WASP oder Scar/WAVE aktiviert. WASP und N-WASP liegen vorerst in autoinhibierter Form vor, diese kann durch RhoGTPasen, PIP2, Profilin, Nck oder Grb2 aufgehoben werden. Durch aktiviertes WASP/N-WASP kommt es zur Stimulation des Arp2/3 Komplexes. Dieser Komplex ist ein stabiler Zusammenschluß zweier aktinähnlicher Proteine Arp2 und Arp3 mit fünf weiteren Untereinheiten: ARPC1-5 (Machesky et al.,

1994). Dieser Proteinkomplex fungiert als Verzweigungsinitiator ausgehend von einem existierenden Aktinfilament (Blanchoin et al., 2000; Higgs et al., 1999; Amann and Pollard, 2001). Hierzu erfolgt der Zusammenschluß von Arp2, Arp3 und eines Aktinmonomers zu einem stabilen Trimer, welches als Keim des neuen Tochter-Asts dient, der dann in Richtung des *barbed end* verlängert wird. Arp2/3 bleibt zwischen dem Aktinfilament und dem Tochterfilament gebunden und verknüpft beide in einem Winkel von 70° (Mullins et al., 1998). Dieses gerichtete Aktinfilamentwachstum findet ununterbrochen statt, bis es durch sog. *capping* Proteine wie CapZ, Gelsolin und Tensin innerhalb von ein bis zwei Sekunden limitiert wird (Cooper and Schafer, 2000; Sun et al., 1999). Wie bereits oben beschrieben, altert das Filament durch die Hydrolyse von ATP, welches an jeder Aktinuntereinheit gebunden war. Letzendlich kommt es auch zur Abdifussion des P_i , womit dem Aktinabbau der Weg geebnet ist. Auch ADF/Cofilin verstärkt die P_i -Dissoziation und schneidet ADP-Aktin vom Filamentende ab. ADP-Aktinmonomere sind so wieder frei löslich im Zytoplasma. Über eine von Profilin katalysierte Reaktion wird ADP gegen ATP getauscht, somit kann ATP-Aktin wieder am *barbed end* eingebaut werden.

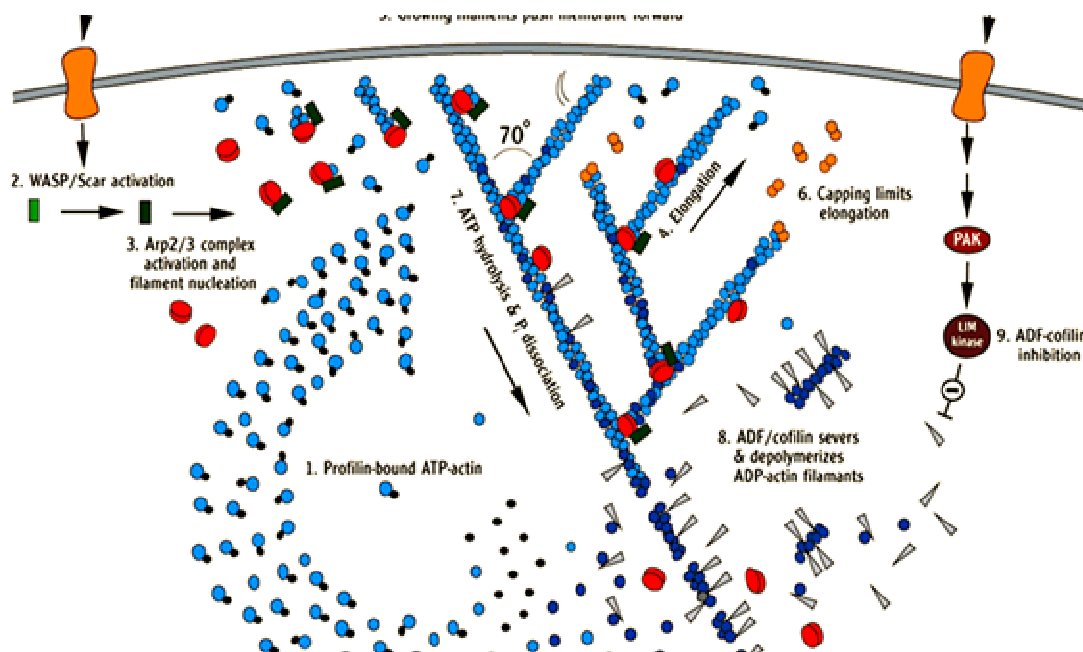


Abb. 1-3: Modell der Aktinnukleation (Dendritic nucleation modell; aus Pollard et al., 2001) Einzelheiten siehe Text.

Eine andere Proteingruppe, die Formine, zeigt ebenfalls die Eigenschaft, neue Aktinfilamente initiieren zu können. Sie beschleunigen jedoch die Bildung unverzweigter Aktinfilamente (Pring et al., 2003; Evangelista et al., 2003). Auch das Protein spire ist ein neuer, erst vor kurzem in *Drosophila* entdeckter Aktinpolymersator, der über einen völlig

neuen, derzeit noch nicht vollständig erforschten Mechanismus zur Aktinnukleation beiträgt (Quinlan et al., 2005; Kerkhoff et al., 2006).

1.2.1.3 Regulation durch RhoGTPasen

Wie bereits oben beschrieben, wird die Aktinpolymerisation durch Signalkaskaden vermittelt. Ein wichtiger Bestandteil dieser Kaskaden sind RhoGTPasen (Takai et al., 2001; Etienne-Manneville et al., 2002).

Sie gehören zur Gruppe der Ras-Gruppe assoziierten GTP bindenden p21- Proteine. Zur Gruppe der Rho-GTPasen zählen 22 Proteine, die wiederum in acht Untergruppen eingeteilt werden können. Davon sind CDC42, Rac und Rho die am besten untersuchten RhoGTPasen (Jaffe and Hall, 2005).

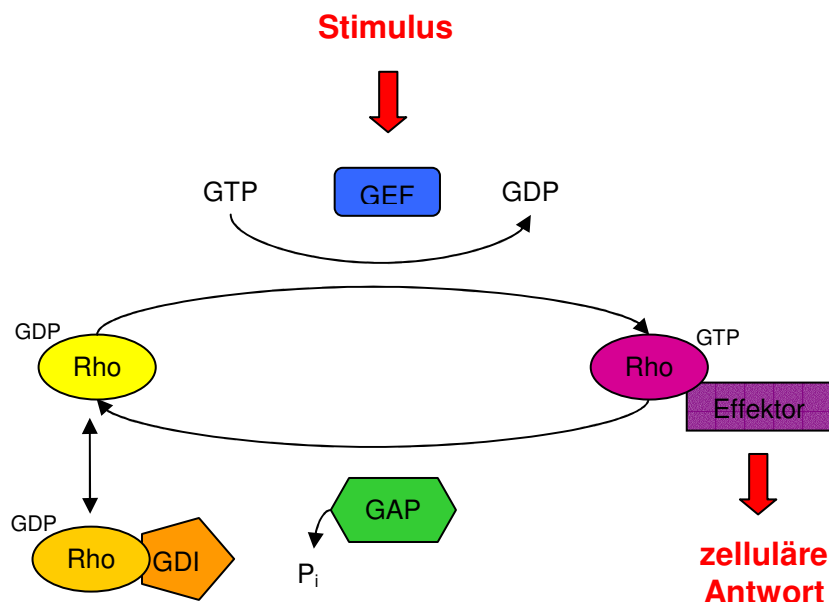


Abb. 1-4: Der RhoGTPase Zyklus

zwischen der GDP-gebundenen inaktiven und der GTP-gebundenen aktiven Form. Stimulusgetriggert kommt es zur GEF-gesteuerten Aktivierung von Rho, welches durch die Interaktion mit Effektorproteinen eine zelluläre Antwort generiert.

Rho-GTPasen liegen zunächst in inaktiver Form mit gebundenem GDP vor. Um mit Effektorproteinen interagieren zu können, müssen RhoGTPasen durch den Austausch von GDP zu GTP aktiviert werden. So existieren sog. molekulare Schalter, welche die RhoGTPase Aktivität regulieren: GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) tauschen GDP gegen GTP (Schmidt and Hall, 2002), GAPs (*GTPase activating proteins*) stimulieren die intrinsische GTP-Hydrolyse durch GTPasen (Bernards et al., 2003) und GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) blockieren die spontane GDP Dissoziation (Olofsson et al., 1999). Im GTP-gebundenen aktiven Zustand können

RhoGTPasen ihre regulatorischen Funktionen durch die konformationsspezifische Interaktion mit ihren Effektorproteinen ausüben (s. Abb. 1-4). Bisher wurden über 50 Effektoren identifiziert, u.a. Serin/Threonin-Kinasen wie PAK, Tyrosinkinasen, Lipidkinasen und Lipaseoxidasen.

Die vielfältigen Funktionen der RhoGTPasen kann man zwei Gruppen zuordnen. Eine Gruppe umfasst Funktionen wie die Regulation des Aktinzytoskeletts, auf die später näher eingegangen wird, die Regulation der Mikrotubulidynamik, der Genexpression zytoskelettaler Komponenten und die Beeinflussung von Enzymaktivitäten des Lipidmetabolismus. Die zweite Gruppe beinhaltet die Kontrolle des Zellzyklus, insbesondere der M-Phase und der G1-Progression. Auch die Zellmorphogenese, hier v.a. Zell-Zell Interaktionen und die Zellpolarität, werden neben der Zellmigration durch RhoGTPasen reguliert (Jaffe and Hall, 2005).

Die RhoGTPasen CDC42, RhoA und Rac1 spielen bei der Polymerisierung und Organisation von Aktinfilamenten eine zentrale Rolle. Sie sind v.a. bei der Bildung und dem Zusammenschluß von kontraktilen Aktin- und Myosinfilamenten beteiligt.

Hinsichtlich der Aktinfilament-Organisation werden die verschiedenen Effektorproteine in engen Grenzen reguliert. V.a. die Koordination des Zusammenspiels von Proteinen, die die Polymerisierung vorantreiben (Arp2/3, Formine) und solchen, die den Abbau triggern (z.B. Cofilin; s. 1.3) ist von großer Bedeutung.

Rac und CDC42 initiieren die Aktinpolymerisation über die Aktivierung des Arp2/3 Komplex, führen aber zu morphologisch unterschiedlichen Aktinstrukturen (s.u.). Beide RhoGTPasen aktivieren Arp2/3 indirekt über Proteine der WASP Familie (WASP, N-WASP, WAVE). So bindet CDC42-GTP direkt an N-WASP und beendet so die Autoinhibition, welche die Arp2/3 Bindestelle involviert und was zu einer Arp2/3-Aktivierung führt. Die Bindung von Rac an einen Komplex, welcher WAVE inhibiert führt zur Komplexdissoziation und Freisetzung von aktiven WAVE, das wiederum den Arp2/3-Komplex stimuliert. Die Aktinpolymerisation kann aber auch Rho-vermittelt durch Formine geschehen. Rho aktiviert so mDia1, ein Formin, welches die Aufgabe hat, an den Profilin-Aktin-Komplex zu binden und ihn dann an das Filamentende zu bringen.

Wie bereits oben angedeutet, kann die Bildung verschiedener Aktinstrukturen auf die Signaltransduktion unterschiedlicher RhoGTPasen zurückgeführt werden. So ist RhoA für die Regulation von Stressfasern und fokalen Adhäsionen zuständig (Ridley and Hall, 1992), wohingegen Rac Lamellipodien und *membrane ruffles* (Ridley et al., 1992) und CDC42 Filopodien und *microspikes* beeinflusst (Nobes and Hall, 1995; Kozma et al., 1995).

Auch zahlreiche Interaktionen verschiedenener RhoGTPasen untereinander sind bekannt. Beispielsweise aktiviert CDC42 Rac und auch Rho. Beispielsweise wird so die Konzentration einzelner GTPasen reguliert, oder es kommt zur zeitgerechten Aktivierung, was für den Ablauf der Signalkaskaden bei Migration und Adhäsion von großer Bedeutung ist (Nobes et al., 1995).

Die Aktinfilamentorganisation kann zusätzlich durch RhoGTPasen beeinflusst werden. Dies geschieht einerseits durch die Rho-vermittelte Aktivierung von Myosin-light-chain (MLC) Phosphatasen (Riento and Ridley, 2003). Und andererseits über Rac und CDC42, die durch aktives Arp2/3 zum einen die Filamentelongation verstärken (Svitkina et al., 2003) und zum anderen über die Aktivierung von *actin bundling proteins*, z.B. Fascin, die die Quervernetzung der Filamente vorantreiben (Vignjevic et al., 2003).

1.2.2 Podosomen

Zellen können über verschiedenste Adhäsionsstrukturen mit ihrem Substrat in Verbindung treten. Dies können neben fokalen Adhäsionen, fibrillären Adhäsionen und fokalen Komplexen auch sog. Podosomen sein.

Podosomen sind hochdynamische, aktinreiche Adhäsionsstrukturen. Mittlerweile ist eine Vielfalt von Zellen bekannt, die Podosomen ausbilden: Beispielsweise Zellen des mononukleären Phagozytosesystems: Monozyten (Marchisio et al., 1987), Makrophagen (Lehto et al., 1982; Linder et al., 1999), Osteoklasten (Marchisio et al., 1984), und dendritische Zellen (Burns et al., 2001). Darüber hinaus wurden Podosomen-artige Adhäsionen auch in glatten Muskelzellen (Fultz et al., 2000; Hai et al., 2002; Gimona et al., 2003) und Endothelzellen (Moreau et al., 2003; Osiak et al., 2005), aber auch in transformierten Fibroblasten (Tarone et al., 1985; Nakamura et al., 1993; Mizutani et al., 2002) und Karzinomzellen (Schuuring et al., 1993), in letzteren beiden Zelltypen als Invadopodien bezeichnet, beschrieben. Podosomen sind hauptsächlich in Gruppen angeordnet und besitzen mit einer Halbwertszeit von 2-12 Minuten eine hohe Dynamik. Das einzelne Podosom scheint sich in eng definierten Grenzen zu bewegen, wohingegen die Bewegung einer Gruppe durch Auflösung der Podosomen am hinteren Ende der Zelle und Neubildung an der Front geschieht (Destaing et al., 2003; Linder and Aepfelbacher, 2003).

Podosomen zeigen viele Ähnlichkeiten mit klassischen Matrixkontaktstrukturen wie z. B. fokalen Adhäsionen, aber unterscheiden sich hinsichtlich wichtiger struktureller und funktioneller Aspekte. So sind Podosomen mit einer Halbwertszeit von 2-12 Minuten hochdynamisch und spielen auch eine Rolle bei Invasivität und Matrixremodelling.

1.2.2.1 Aufbau

Podosomen sind Ausstülpungen der Zellmembran und nehmen Integrin-vermittelt Kontakt zur extrazellulären Matrix und anderen Zellen auf (Marchisio et al., 1988; Gaidano et al., 1990; Muto et al., 1997). Podosomen zeigen eine typische Kern-Ring Zweiteilung (s. Abb. 1-5). Der Kern mit einem Durchmesser von ca. $0,3\mu\text{m}$ und einer Höhe von ca. $0,5\mu\text{m}$ (Gavazzi et al., 1989; Destaing et al., 2003) besteht hauptsächlich aus eng gebündelten Aktinfilamenten und aktinregulatorischen Molekülen wie WASP/N-WASP (Linder et al., 1999; Mizutani et al., 2002), Arp2/3 Komplex (Linder et al., 2000; Burns et al., 2001) und CDC42 (s.u.). Durch seinen starren Aufbau fungiert der Kern als Ankerpunkt für die Zellbewegung am *leading edge* oder bei ventralen Protrusionen während der Matrixinvasion. Der Kern ist unmittelbar von einer Wolke mit G- bzw. F-Aktinmolekülen umgeben, die als Ressourcen für den hochdynamischen *Aktinturnover* dienen (Destaing et al., 2003). Die Ringstruktur enthält v.a. adhäsionsvermittelnde Proteine wie Vinkulin, Talin und Paxillin (Gavazzi et al., 1989; Zamboni-Zallone et al., 1989). Kern- und Ringstruktur sind durch Proteine wie α -Aktinin miteinander verbunden. Podosomen sind durch Integrine, welche über die gesamte Oberfläche verteilt sind, in der extrazellulären Matrix verankert. Es zeigt sich eine Isotyp-spezifische Lokalisation: $\beta 1$ Integrine finden sich v.a. am Kern, wohingegen $\beta 2$ und $\beta 3$ Integrine hauptsächlich an der Ringstruktur lokalisieren (Marchisio et al., 1988; Pfaff et al., 2001; Duong et al., 2000).

Drei podosomale Strukturmerkmale erleichtern die Differenzierung von anderen F-Aktin-reichen Zelladhäsionen:

- 1) Die Podosomenformation erfolgt an der Substrat-zugewandten Zellseite und im Zuge eines Zell-Substrat-Kontakts
- 2) Das Podosom besteht aus einem F-Aktin-reichen Kern, umgeben von einer Ringstruktur, welche Proteine wie z. B. Vinkulin und Talin enthält
- 3) Der Durchmesser eines Podosoms beträgt ca. $0,5\mu\text{m}$

Im Gegensatz dazu enthalten fokale Adhäsionen und fokale Kontakte keine F-Aktin-reiche Kernstruktur. Möglicherweise sind sie abhängig von der Neusynthese der Strukturproteine, was für Podosomen aufgrund ihres Recyclingmechanismus nicht erforderlich ist. Auch hinsichtlich der Dynamik stehen fokale Adhäsionen (3h) den Podosomen (2-12 Minuten) nach.

Mittlerweile wurde eine große Menge an podosomal assoziierten Molekülen identifiziert. Zu nennen sind hier Gruppen wie zytoskelettale Proteine und deren Regulatoren, Tyrosinkinasen, Serin/Threoninkinasen, Integrine und Rho-GTPasen. Die meisten dieser Proteine können eindeutig dem Kern oder der Ringstruktur zugeordnet werden. Daraus ergibt sich auch die Möglichkeit bestimmte Proteine als sog. Marker zu verwenden: Für

den Kern sind das beispielsweise die Aktinregulatoren CDC42-Hs, WASP/N-WASP und Arp2/3-Komplex oder Fimbrin. Marker für die Ringstruktur sind Adhäsionsmediatoren wie Paxillin, Talin, Vinculin (Linder and Aepfelbacher, 2003; Buccione et al., 2004).

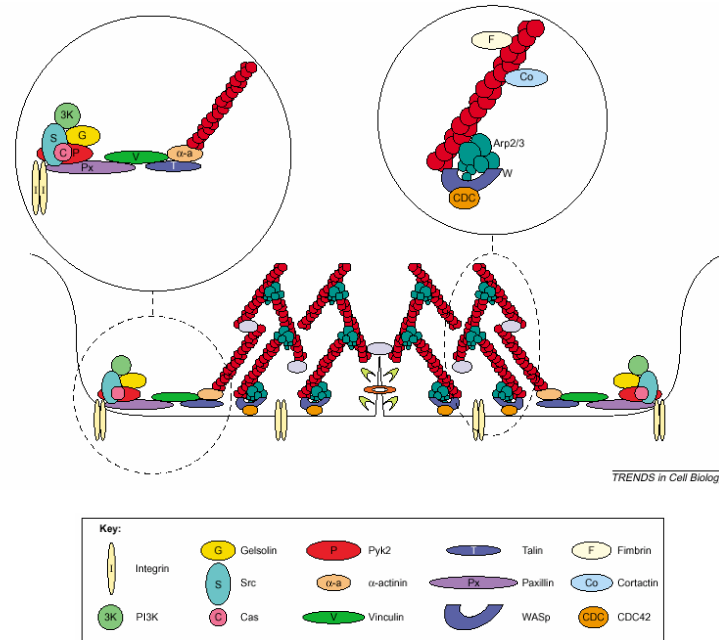


Abb. 1-5: Podosomenmodell. Schematische Darstellung eines Podosoms in der Frontalebene

Mitte: Podosomen stellen Membranausstülpungen dar, an denen Adhäsion und Matrixdegradation stattfinden.

Oben links: Detailausschnitt der Podosomen-Ringstruktur. Die Bindung an die extrazelluläre Matrix erfolgt über Integrine, während Paxillin als Anker für einen intrazellulären Komplex aus Src, Pyk2/FAK, Gelsolin und Phosphoinositolkinasase (PI3K) und p130cas dient.

Oben rechts: Detailausschnitt des Podosomenkerns. Die Aktivierung von WASp/N-WASp durch CDC42 führt zu einem aktivierten Arp2/3 Komplex, von dem aus die Aktin-Polymerisierung startet. Die Aktinfilamente sind durch Cortactin und Fimbrin miteinander verbunden (aus Linder and Aepfelbacher, 2003).

1.2.2.2 Podosomenbildung und -dynamik

Es sind zwei Mechanismen der Podosomenentstehung bekannt. Zum einen die *de novo* Bildung durch Aktinpolymerisierung. Und andererseits durch mikrotubuliabhängige Spaltung von sog. Podosomen-Präkursoren (PCP: *podosome cluster precursor*) in Tochterpodosomen, welche v.a. am *leading edge*, bzw. in der Zellperipherie auftritt (Evans et al., 2003; Kopp et al., 2006; Gimona et al., 2008).

Da Podosomen nur in adhärenenten Zellen beobachtet werden, ist die Grundvoraussetzung für die Podosomenentstehung die Anheftung der Zelle auf ihr Substrat. Dies führt durch *Clustering* und Aktivierung von Integrinen zur Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen, sowie in der Folge zur Aktivierung von PKC (Proteinkinase C). Daraufhin wird Src

aktiviert, was wiederum zur Initiierung des PI3K Signalweges führt, an dessen Ende die Aktivierung von FAK (*focal adhesion kinase*) durch die Phosphoinositole $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ und $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ steht. Die Phosphatidylinositole werden zudem von den RhoGTPasen Rho und Rac beeinflusst. FAK kann Gelsolin, ein Aktinfilament-schneidendes Protein aktivieren, wodurch ein zusätzlicher Einfluß auf den Aktinumsatz entsteht. CDC42 ist wichtig für die Aktinfilamentnukleation. Es aktiviert WASP/N-WASP durch das Aufheben der Autoinhibition. Dadurch kann WASP über die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes die Aktinnukleation initiieren (Übersicht: Linder und Kopp, 2005).

1.2.2.3 Podosomen-Regulation

Podosomen werden durch eine Vielzahl an Signalwegen beeinflusst. Hier sind besonders RhoGTPase-vermittelte Kaskaden, aktinregulatorische Signalkaskaden, die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen und der Einfluß des Mikrotubulsystems hervorzuheben.

Für die RhoGTPasen RhoA, Rac1 und CDC42 wurde ein Einfluß auf Podosomen nachgewiesen, der jedoch von Zelltyp zu Zelltyp etwas differieren kann. So zeigen Burns et al., dass dominant aktive wie auch inaktive Mutanten dieser GTPasen zu einer verminderten Podosomenbildung in humanen Makrophagen und in dendritischen Zellen führt (Linder et al., 1999; Burns et al., 2001). Dem entgegen steht die Beobachtung, dass konstitutiv aktives CDC42 in HeLa, Aorten-Endothelzellen und in Leukämiezellen zu einer vermehrten Podosomenbildung führt (Dutartre et al., 1996; Castellano et al., 2001; Moreau et al., 2003; Billottet et al., 2008). Dies ist nur ein Beispiel dafür, dass die Aktivierung genauso wie die Inaktivierung von RhoGTPasen die Podosomen in gleicher Weise zerstören können. Gerade deshalb ist eine Feinabstimmung des GDP-GTP Zyklus der RhoGTPasen sehr wichtig für ihre Kontrolle (Linder and Aepfelbacher, 2003). Auch die Lokalisierung dieser Proteine im Podosomenkern, am Ort der Aktinpolymerisierung, unterstreicht die wichtige Rolle der RhoGTPasen als zentrale Aktinregulatoren (Linder et al., 1999; Linder and Aepfelbacher, 2003).

Der Kern mit den starren Aktinbündeln spielt für die Stabilität der Podosomen eine wichtige Rolle. Demgegenüber steht die Tatsache, dass der Aktinumsatz, der 2-3-mal schneller ist als die Podosomenhalbwertszeit, hoch dynamisch reguliert wird (Destaing et al., 2003). Alle zur Aktinpolymerisierung benötigten Proteine findet man, wie bereits oben beschrieben, im Kern lokalisiert: CDC42, WASP, Arp2/3 Komplex. Die Entfernung bzw. Inaktivierung eines dieser Proteine führt zur Podosomenauflösung (Linder et al., 2000; Jones et al., 2002). Hier ist v.a. das Wiskott-Aldrich-Syndrom zu erwähnen - ein Immundefizienzsyndrom, bei dem eine Mutation im WASP-Gen zu einer folgenschweren Destabilisierung und damit letztendlich zum Funktionsausfall des Proteins führt. Dadurch haben die Makrophagen von WAS-Patienten keine Podosomen (Linder et al., 1999; Burns

et al., 2001). Gelsolin ist ein weiteres Protein, welches durch das *severing* und *capping* der Aktinfilamente den Aktinturnover reguliert. Gelsolin-defiziente Mäuse entwickeln beispielsweise keine Podosomen (Chellaiah et al., 1998; Chellaiah et al., 2000).

Es wurde bereits sehr früh entdeckt, dass podosomenähnliche Adhäsionen durch Transduktion mit Viren, die v-Src exprimierende Onkogene enthalten, induziert werden können (Tarone et al., 1985; Marchisio et al., 1987). Die Phosphotyrosinkinasen c-src und Csk können auch in Podosomen untransformierter Zellen nachgewiesen werden (Howell and Cooper, 1994). Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass diese Tyrosinkinasen und deren Substrate Pyk2 und p130cas an der Regulation der Podosomen beteiligt sind. Die Hemmung der Tyrosinkinasen z.B. durch PP2 führt in Makrophagen und Osteoklasten zur Podosomenzerstörung, wohingegen die Inhibition der Tyrosinphosphatasen z.B. durch Vanadat zu einer verstärkten Podosomenbildung führt (Tanaka et al., 1995; Linder et al., 2000; Marchisio et al., 1988; Cory et al., 2002).

Mikrotubuli sind ein weiterer Bestandteil der Podosomenregulation. So werden podosomale Strukturen in Osteoklasten durch Mikrotubuli stabilisiert, wohingegen sie in humanen Monozyten und Makrophagen unabdinglich für die Podosomenentstehung scheinen (Babb et al., 1997). Hier ist zum einen die Bildung und zum anderen die Teilungs- und Fusionsrate der Podosomen abhängig von Mikrotubuli (Linder et al., 2000; Evans et al., 2003; Kopp et al., 2006).

1.2.2.4 Funktion

Es gibt verschiedene Hinweise, dass Podosomen wichtige Strukturen der zellulären Adhäsion darstellen. Erstens entstehen sie auf der ventralen Seite nach Substratkontakt, zweitens enthalten sie vermehrt Integrine, drittens entfalten sie engen Kontakt zum Substrat und dienen somit als Ankerpunkt und führen zu höherer Stabilität und viertens zeigen WASP-defiziente Makrophagen einen Adhäsionsdefekt (Linder et al., 1999). Die Tatsache, dass sie vor allem am *leading edge* von migrierenden Zellen gebildet werden sowie der hohe Gehalt an β 2-Integrinen, legen eine zusätzliche Funktion der Podosomen bei der Migration nahe. Es wird angenommen, dass die räumliche Nähe der Adhäsionsvermittelnden β 2-Integrine zu Membranprotrusionen als Anheftungsstelle der Zelle während der Translokation dient (Burns et al., 2001).

Podosomen werden typischerweise in Zellen gefunden, die Gewebegrenzen überschreiten. Zu nennen sind hier Immunzellen wie Makrophagen, dendritische Zellen oder Osteoklasten, aber auch Krebszellen. Sie werden mit der invasiven Fähigkeit dieser Zellen in Verbindung gebracht, nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass Podosomen Matrix-Metalloproteasen wie z.B. MT-1-MMP, MMP-2 oder MMP-9 enthalten und mit Orten des Matrixabbaus co-lokalisieren (Sato et al., 1997; Delaisseé et al., 2000; Linder et al., 2007; Carman et al., 2007). Podosomen können so den Abbau von extrazellulären

Matrixproteinen, wie z.B. Fibronectin oder Kollagen vermitteln (Chen et al., 1984; Kelly et al., 1994; Burgstaller et al., 2005; Osiak et al., 2005). Beispielsweise finden sie sich in der *sealing zone* von Osteoklasten, Orten an denen die Knochenresorption stattfindet (Destaing et al., 2003; Jurdic et al., 2006).

1.3 ADF/Cofilin

ADF/Cofilin ist eine der Proteinfamilien, die eine wichtige Rolle hinsichtlich der Aktindynamik an der Plasmamembran während der Zellprotrusion spielen.

Der Aktinfilament-Turnover geht *in vivo* ca. 200-mal schneller von statten als *in vitro* (Theriot et al., 1991). Hierfür sind verschiedene Proteine verantwortlich, wobei die Mitglieder der Gelsolin- und der ADF/Cofilin-Familie am besten erforscht sind. Diese 200-fache Erhöhung der *off rate* wird durch zwei Mechanismen gewährleistet. Zum einen durch *severing*, wodurch das Filament in kleinere Stücke geteilt wird. Für diesen Prozess ist v.a. Gelsolin verantwortlich. Zusätzlich fungiert Gelsolin auch als *capping protein* und verhindert damit die Elongation. Der zweite Mechanismus besteht in einer beschleunigten Monomer-Dissoziation (erhöhte *off rate*) am *pointed end* (Cooper et al., 2000). Diese wird hauptsächlich ADF/Cofilin zugeschrieben, welches aber auch am *severing* beteiligt ist (Carlier et al., 1997).

Die ADF/Cofilin Familie ist mit ihren 28 Mitgliedern im gesamten Spektrum der eukaryotischen Zellen vertreten. Bereits im Jahre 1980 wurden erste Mitglieder wie z.B. Actophorin in Acanthamoeben, Depactin in Oozyten des Seesterns und schließlich auch Cofilin in Vertebraten unabhängig voneinander entdeckt. Erste Analysen des Aufbaus dieser Proteine zeigten viele Gemeinsamkeiten, so dass sie in einer Gruppe zusammengefasst wurden. Dennoch muss man erwähnen, dass trotz dieser strukturellen Homogenität Unterschiede funktioneller Art bestehen, was darauf hinweist, dass diese Proteine z.T. unterschiedliche Aufgaben in den verschiedenen Organismen innehaben. Heute umfasst diese Familie 12 ADF/Cofilin Subtypen unter den Vertebraten, gefolgt von 11 Mitgliedern in Pflanzen und Hefen. Drosophila und Schimmelpilze zeigen je zwei Vertreter dieser Familie. Säugetiere verfügen über drei Mitglieder der ADF/Cofilin Familie: ADF (*actin depolymerizing factor*), ubiquitär vorkommendes Cofilin-1 und muskelspezifisches Cofilin-2 (Bamburg et al., 1999).

1.3.1 Funktion

Cofilin werden mehrere, auf den ersten Blick gegensätzliche Funktionen zugeschrieben. Die Hauptaufgabe von Cofilin besteht einerseits in der Erhöhung der Dissoziationsrate am *pointed end* (Bamburg, 1999; Carlier et al., 1997; Van Troys et al., 2008). Dadurch wird

der Aktinmonomer-Nachschub für neue Polymerisierung am *leading edge* aufrechterhalten. Hier dient Cofilin als Recyclingfaktor. Andererseits kommt Cofilin eine Schlüsselrolle bei extrazellulär stimulierten Membran-Protrusionen zu. Die Aufgabe von Cofilin umfasst hier das *severing* von langen Aktinfilamenten und die Generierung zusätzlicher *barbed ends*, die wiederum Ausgangspunkt für die Polymerisierung neuer Filamente sind (Chan et al., 2000; Du and Frieden, 1998). Cofilin spielt dadurch eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Initiierung und Wegweisung von stimulierten Zellbewegungen (Edmonds et al., 1996).

Beide Funktionen basieren auf der kooperativen Bindung an F-Aktin und der dadurch verursachten Torsion des Aktinfilaments (Hawkins, 1993; Hayden, 1993). Cofilin zeigt hierbei eine ca. 100-mal höhere Affinität für ADP-Aktin als für ATP-Aktin (Maciver et al., 2002). Es existieren zwei Bindungsstellen für Aktin, eine am N-Terminus und eine zweite, die C-terminal liegt. Die N-terminale Bindungsstelle (AS 110-128) ist essentiell für die Aktinbindung und bindet die Aktindomäne 1 von G- sowie F-Aktin. Die zweite Bindungsstelle (AS 150-154) vermittelt die F-Aktinbindungsspezifität und bindet an die zweite longitudinal assoziierte Subdomäne des Aktins.

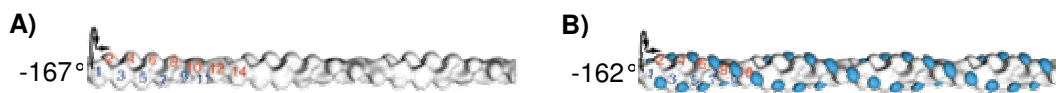


Abb. 1-6: Cofilin-Bindung und ihr Effekt auf die Torsion des Aktinfilaments (aus Bamburg et al., 1999)

- A) Aktinfilament mit einem Drehwinkel von -167°
- B) Durch Interkalierung von Cofilin ändert sich der Winkel auf -162° , dadurch kommt es zur Destabilisierung des Aktinfilaments.

Durch die kooperative Bindung des Cofilins an die entsprechenden Bindungsstellen im Aktinfilament kommt es zur Interkalierung des Moleküls zwischen zwei longitudinal assoziierten Aktinuntereinheiten (Renoult et al., 1999; McGough et al., 1997). Dadurch wird die Drehung der Aktinfilamente verändert: Eine Aktinuntereinheit rotiert um 5° , wohingegen die Steigung der Untereinheiten konstant bleibt und sich die Filamentlänge nicht verändert (s. Abb. 1-6). Dennoch zeigt sich eine Abnahme der Überschneidung der einzelnen Aktinfilamente um 25%, von 35-38nm auf 27nm. Dies führt zu einer Destabilisierung der lateralen Aktin-Aktin Kontakte im Filament, wodurch die Aktinfilamente leichter getrennt werden können (s. Abb. 1-7; Mc Gough, 1997, Erickson, 1989). Dadurch werden Aktin-Monomere am *pointed end* 30-fach schneller abgebaut, was sich in einer *off rate* von $9s^{-1}$ zeigt, die sich in Anwesenheit von Profilin sogar noch auf $125s^{-1}$ steigert. Nimmt man noch eine geringe *severing* Funktion an, so kommt man auf

die postulierte *off-rate* von 200s^{-1} (Dos Remedios et al., 2003). Cofilin bleibt an den dissoziierten Aktinmonomeren gebunden und verhindert dadurch den Austausch von ADP gegen ATP. Damit ist das Aktinmonomer-Recycling deutlich verlangsamt, es stehen weniger Rohstoffe für die Aktinpolymerisation am *barbed end* zur Verfügung und ein zu rascher Aktinturnover wird gebremst (Maciver et al., 1994).

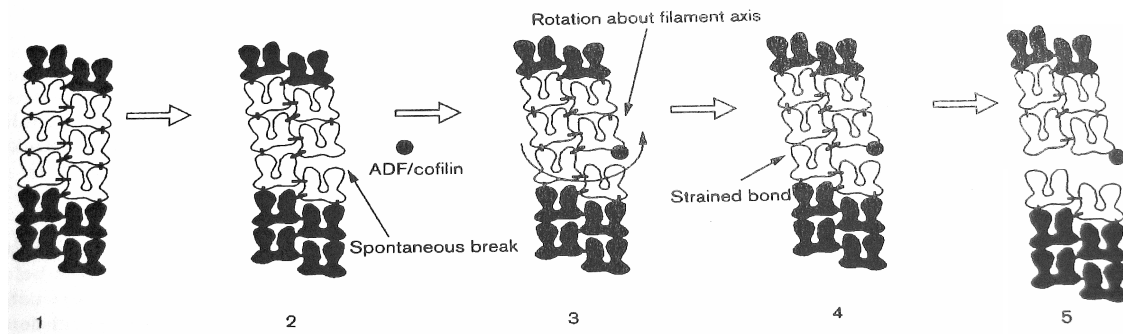


Abb. 1-7: Severing Mechanismus durch Cofilin (aus Maciver et al., 1998; Einzelheiten s. Text)

1.3.2 Regulation

Die Regulation der Cofilinaktivität scheint in verschiedenen Zellen eine unterschiedlich wichtige Stellung einzunehmen. In ruhenden Zellen ist Cofilin zumeist phosphoryliert und damit inaktiv. Der Aktin-*turnover* befindet sich im Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau. Nach Stimulation kommt es zur Dephosphorylierung und Aktivierung des Cofilins und damit zur Bewegungsinitiation (Moriyama et al., 1996; Okada et al., 1996). In Karzinomzellen hingegen ist fast die Hälfte des zellulären Cofilinpools in aktiver Form vorhanden (Chan et al., 2000; Zebda et al., 2000).

Der am besten erforschte Regulationsmechanismus ist die Phosphorylierung des Ser3 am N-Terminus des Cofilinmoleküls (Bamburg et al., 1999). Dadurch ist Cofilin nicht mehr in der Lage, an Aktinfilamente zu binden und seine Aktinfilament-spaltende, depolymerisierende Aktivität auszuüben. Derzeit sind zwei Kinasefamilien bekannt, welche als *downstream* Effektoren der RhoGTPasen Cofilin phosphorylieren können: LIM (Lin-11/Is1-1/Mec-3) Kinasen und TES (*testicular protein*) Kinasen (Arber et al., 1998; Dan et al., 2001; Rosok et al., 1999; Toshima et al., 2001; Yang et al., 1998). Die beiden Isoformen LIMK1 und LIMK2 werden, vermittelt durch verschiedene RhoGTPase Signalwege, phosphoryliert und aktiviert. Hervorzuheben ist hier die Aktivierung von LIMK1 durch Rac und CDC42 via PAK1 bzw. PAK4 (Edwards et al., 1999; Abo et al., 1998; Dan et al., 2001; Ahmed et al., 2008). TESK1 und TESK2 sind zwei weitere Kinasen, deren Aktivierung Zelladhäsion-vermittelt über Integrine geschieht (Toshima et

al., 2001). Desweiteren wurden NRK und NESK als Cofilin-phosphorylierende Proteine identifiziert. Da diese Proteine jedoch v.a. in Skelettmuskelzellen während der Embryogenese exprimiert werden, ist ihre Bedeutung als Cofilin-Kinasen im Gegensatz zu LIMK und TESK eher gering (Nakano et al., 2003).

Die Reaktivierung von Phosphocofilin wird von Phosphatasen durch Dephosphorylierung gewährleistet. Unter ihnen finden sich neben den unspezifischen Phosphatasen PP1, PP2A (Ambach et al., 2000), PP2B (Meberg et al., 1998) und PP2C (Zhan et al., 2003), zwei neu entdeckte Cofilin-spezifische Phosphatasen namens Slingshot (Niwa et al., 2002) und Chronophin (Gohla et al., 2005). Durch Bindung von Slingshot wird LIMK1 dephosphoryliert und inaktiviert. Dadurch liegt Cofilin weniger stark phosphoryliert vor und ist vermehrt aktiv (Soosairajah et al., 2005). Chronophin hingegen dephosphoryliert Phosphocofilin direkt (Gohla et al., 2005).

Ein weiteres Protein, welches im weiteren Sinne mit der Cofilinregulation durch Phosphorylierung verbunden ist, ist 14-3-3 ζ . Es bindet an phosphoryliertes inaktives Cofilin und verhindert so die Dephosphorylierung und damit Aktivierung (Gohla and Bokoch, 2002) (s. auch Abb. 1-8).

Die depolymerisierende Aktivität des Cofilins ist pH abhängig (Bernstein et al., 2000). So zeigt sich im alkalischen Bereich ($\text{pH} > 7,3$) eine rasche Depolymerisierung (Hayden et al., 1993; Maciver et al., 1998), wohingegen F-Aktin im sauren Milieu ($\text{pH} < 6,8$) eher durch Cofilin stabilisiert wird. Die physiologische Relevanz dieses Vorgangs ist derzeit jedoch noch unklar (Bamburg et al., 1999).

Ein weiterer Regulationsmechanismus umfasst die Bindung von Cofilin an Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylinositol-4-Monophosphat (PIP) oder an Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) (Yonezawa et al., 1990). Durch diese Interaktion wird die Aktin-Bindungsstelle im Cofilinmolekül blockiert (Yonezawa et al., 1991; Kusano et al., 1999). PIP₂ kann durch Phospholipase C hydrolysiert werden und dadurch Cofilin in einen funktionsfähigen Zustand zurückversetzen (Yonezawa et al., 1991). Ein anderer Regulationsmechanismus läuft über die durch die PI3- (Phosphoinositol-3) Kinase vermittelte Phosphorylierung von PIP₂ zu PIP₃. Der genaue Mechanismus ist noch unklar, jedoch konnte gezeigt werden, dass durch die Blockierung der PI3 Kinase die Cofilin-Dephosphorylierung gehemmt wird und Cofilin dadurch länger aktiv bleibt (Lee et al., 2000).

Cofilin kann auch durch kooperative oder kompetitive Bindung verschiedener Interaktionspartner, wie z.B. Tropomyosin, CAP und AIP1, reguliert werden. Dadurch

können die F-Aktinbindung und damit die Depolymerisierung, die ADP-Aktin-Bindung aber auch der Phosphorylierungsgrad des Cofilin-Proteins beeinflusst werden.

Die kompetitive Bindung von Tropomyosin, welches entlang der Aktinfilamente liegt, verhindert die Depolymerisierung (Bernstein and Bamburg, 1982) und das *severing* (DesMarais et al., 2002) durch Cofilin. Zusätzlich wird die Bindung des Arp2/3 Komplexes und damit die Verzweigung des Filaments unterbunden (Blanchoin et al., 2001). Tropomyosin scheint ein physiologischer Gegenspieler des Cofilins zu sein (Ono et al., 2002), so dass ein Fließgleichgewicht zwischen Tropomyosin-gebundenem stabilem Aktin und Cofilin-gebundenem dynamischem Aktin existiert (Cooper et al., 2002). Dadurch, dass Tropomyosin auch in der Lage ist, die Cofilin- und Arp2/3 Aktivität räumlich auf bestimmte Zellkompartimente zu beschränken, kann der Aktinauf- und -abbau in migrierenden Zellen sehr genau gesteuert werden (Cooper et al., 2002; Ono et al., 2003). CAP (*Cyclase associated protein*) fördert die Dissoziation des Cofilin-G-Aktin-Komplexes, setzt mehr aktives dephosphoryliertes Cofilin frei und unterstützt damit die F-Aktin Depolymerisierung am *pointed end* (Balcer et al., 2003; Moriyama and Yahara, 2002). Es scheint auch durch Erhöhung des Austausches von ADP- gegen ATP-Aktin das Wachstum am *barbed end* voranzutreiben.

AIP1 (*Actin interacting protein 1*) allein hat nur geringe Auswirkungen auf den zellulären G-Aktinpool, aber als Cofaktor von Cofilin erhöht es die Aktinfilamentzerfallsrate dadurch, dass es bereits geschnittene Filamentenden bedeckt (Ono et al., 2003; Fujibuchi, 2005). Auch beim *severing* von Aktinfilamenten scheint AIP zusammen mit Cofilin eine aktive Rolle zu spielen (Okada et al., 1999; Rodal et al., 1999).

PAK Proteinkinasen zeigen eine hohe Sequenzhomologie im Vergleich mit Ste20 Proteinkinasen von Hefen, welche in der Pheromonkaskade eine Rolle spielen (Wu et al., 1996). Andere PAK-verwandte Proteine finden sich in Würmern und Fliegen.

Wie bereits oben beschrieben, sind derzeit sechs verschiedene humane PAK Isoformen bekannt, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit in Gruppen zusammengefasst werden können. Die Isoformen PAK1-3 gehören der Gruppe A an, wohingegen PAK4-6 zur Gruppe B zählen (Bokoch et al., 2003; Dan et al., 2001; Jaffer and Chernoff, 2002).

Die Mitglieder der Gruppe A umfassen PAK1, welches im Gehirn, Muskel und in der Milz exprimiert wird, ubiquitär vorkommendes PAK2 und PAK3, welches nur im Gehirn anzutreffen ist.

PAK4, das erste und gleichzeitig am besten untersuchte Mitglied der Gruppe B PAKs, wurde 1998 bei einem PCR-*screening* mit degenerierten Primern der PAK2 Kinasedomäne entdeckt (Abo et al., 1998). Es wird nahezu in allen Geweben, in größten Mengen jedoch in der Prostata, im Hoden und im Colon exprimiert. PAK4 null Embryos von Mäusen sterben nach 10 Tagen. Dafür werden Defekte der Kardiomyozyten verantwortlich gemacht. Dennoch treten auch neuronale Defekte auf, die auf einer dysfunktionellen Neuronendifferenzierung und -migration beruhen (Qu et al., 2003). PAK4 scheint aber auch an der Regulation von fokalen Adhäsionen und Filopodien beteiligt zu sein, beides Strukturen, die für die Zellmigration von Bedeutung sind (Callow et al., 2002; Qu et al., 2001). So zeigen PAK4-defiziente Zellen eine höhere Anzahl an fokalen Adhäsionen, wohingegen sie bei Überexpression von konstitutiv aktivem PAK4 weniger fokale Adhäsionen ausbilden (Qu et al., 2001; Qu et al., 2003).

PAK6, welches mit dem Androgenrezeptor interagiert, zeigt hohe Aktivität in Hoden und Prostata, aber auch in Gehirn, Niere und Plazenta (Yang et al., 2001; Jaffer and Chernoff, 2001). Das letzte Mitglied der Gruppe B, PAK5, ist genauso wie PAK3 nur im Gehirn zu finden (Pandey et al., 2002). Eine tabellarische Zusammenfassung der PAK Isoformen und deren Expressionsorte findet sich in Tabelle 1-1.

Tabelle 1-1: PAK Isoformen und deren Expressionsorte

	Isoform	Expressionsort
Gruppe A	PAK1	Gehirn, Muskel, Milz
	PAK2	ubiquitär
	PAK3	Gehirn
Gruppe B	PAK4	ubiquitär; (v.a. Prostata, Hoden, Colon)
	PAK5	Gehirn
	PAK6	Hoden, Prostata, Gehirn, Niere, Plazenta

Der folgende Text wird sich vornehmlich auf jeweils einen Vertreter der beiden Untergruppen, die Isoformen PAK1 und PAK4, konzentrieren, die auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

1.4.2 Aufbau

Das PAK Protein besteht aus zwei Einheiten: einer regulatorischen N-terminalen und einer katalytischen C-terminalen Region. PAK1 liegt als Homodimer in einer trans-autoinhibierten Konformation vor: die N-terminale regulatorische Untereinheit interagiert mit der C-terminalen katalytischen Domäne des jeweils anderen Moleküls (Parrini et al., 2002).

PAK1 und PAK4 unterscheiden sich hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus in zwei Punkten: dem zusätzlichen Vorhandensein einer AID (*auto inhibitory domain*) in PAK1 und der Verteilung der prolinreichen PXXP Motive. Man muß jedoch festhalten, dass derzeit über eine andersartige AID im PAK4 Protein spekuliert wird. Ansonsten zeigen beide Isoformen große Ähnlichkeit (Wells et al., 2005).

Die N-terminale PBD (*p21 binding domain*), auch CRIB (*CDC42 and Rac interactive binding domain*) genannt, enthält streng konservierte Proteindomänen, welche vornehmlich an der Bindung und Aktivierung durch die RhoGTPasen Rac und CDC42 beteiligt sind (Burbelo et al., 1995). Diese CRIB Domäne erstreckt sich von aa75-90.

Im PAK1 Protein grenzt zusätzlich eine überlappende AID (*auto inhibitory domain*) Domäne an, welche wesentlich zur Autoinhibition von PAK1 beiträgt (s. Abb. 1-9B). Sequenzen der AID Domäne steuern zusätzlich der allgemeinen Bindungsaffinität für Rho GTPasen bei (Sells et al., 1997; Lei et al., 2000).

Zwischen der PBD und der Kinase Domäne befindet sich eine Region, welche viele saure Aminosäuren enthält (*acidic region*). Ihre funktionelle oder regulatorische Bedeutung für das PAK Protein ist derzeit nicht bekannt.

Die hochkonservierte Kinase Domäne (KD) befindet sich am C-terminalen Ende. Im inaktiven PAK1 Protein wird die Kinaseaktivität durch intramolekulare Interaktionen inhibiert (s. Abb. 1-9B). Erst durch GTPase Bindung und Autophosphorylierung wird diese Inhibition aufgehoben und die Kinaseaktivität kann entfaltet werden.

Des Weiteren existieren noch fünf prolinreiche Motive (PXXP), die an die SH3 (*src homology 3*) Region von Nck, Grb2 und PIX binden können. Es handelt sich dabei um vier konservierte regelhafte PXXP SH3 Domänen, die an das Adapterprotein Nck (Bokoch et al., 1996) und an Grb2 binden (Puto et al., 2003), neben einer konservierten eher nicht klassischen, aber hoch spezifischen SH3 Bindedomäne für PIX (*PAK-interacting exchange factor; Rac/CDC42 GEF6*) (Manser et al., 1998). Diese PXXP Regionen sind in PAK1 und PAK4 unterschiedlich platziert: in PAK1 befinden sich zwei Motive bereits vor

der PBD, ein Motiv zwischen AID und PIX und zwei Motive zwischen PIX und der KD, im PAK4 Protein finden sich lediglich zwei Motive vor und drei Motive nach der PIX Region.

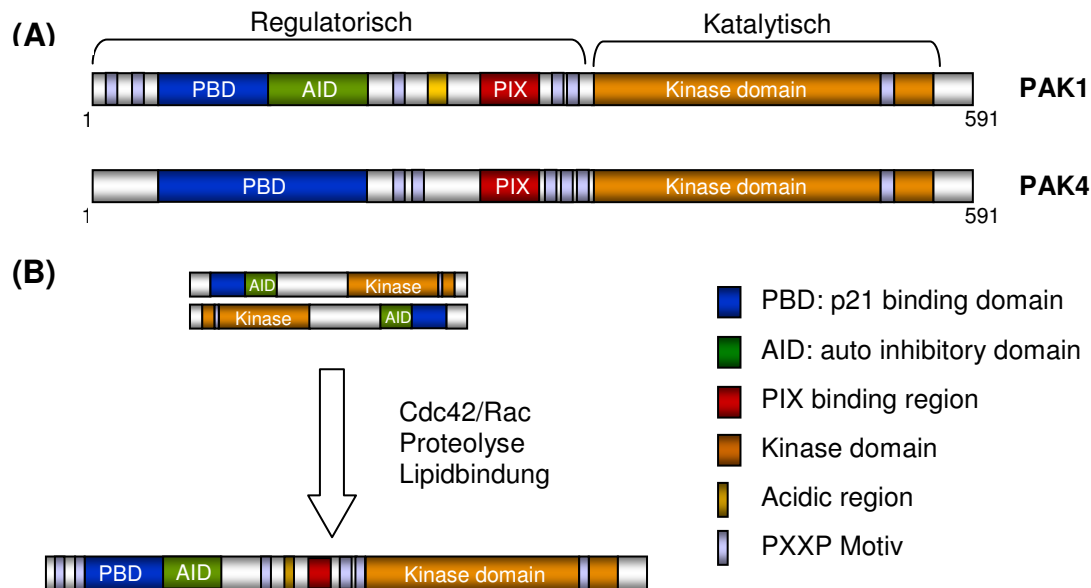


Abb. 1-9: A) schematische Darstellung PAK1 und PAK4 im Vergleich
 B) PAK1-Aktivierung: Aufhebung der autoinhibitorischen intramolekularen Interaktion

1.4.3 Regulation

1.4.3.1 Autoinhibition

Bei PAK1 findet sich zum einen eine Homodimerisierung, die zu einer trans-Autoinhibition führt: Die KD Domäne eines PAK1 Moleküls bindet an die C-terminale katalytische Domäne des anderen Proteins (Parrini et al., 2002). PAK1 zeigt aber auch eine Autoinhibition durch Interaktion der Kinase Domäne mit der AID (*auto inhibition domain*), einem Teil der regulatorischen Domäne. Mehrere Studien zeigen, dass die Bindung von CDC42 bzw. Rac diese Autoinhibition durch Konformationsänderung der AID Region aufheben kann (s. Abb. 1-9B; Lei et al., 2000; Zhao et al., 1998; Morreale et al., 2000). Dadurch kommt es zur Autophosphorylierung des Proteins, was zu einer vollständigen Stimulation der Kinaseaktivität von PAK1 führt. Es sind mehrere Stellen für die Autophosphorylierung bekannt. Phosphorylierung von Thr 423 führt zur dauerhaften Aufhebung der Autoinhibition und zur vollen Funktion der KD (Yu et al., 1998; Gatti et al., 1999; Zenke et al., 1999). Auch die Phosphorylierung von Ser 144 der KD Domäne, führt zur Aktivierung der Kinase (Chong et al., 2001), wohingegen Phosphorylierung von Ser 198/203 zur *down*-Regulation der PIX-PAK Interaktion führt.

Gruppe II PAKs werden wahrscheinlich ebenfalls intramolekular reguliert, enthalten aber keine AID. Einen Hinweis dafür liefert die Tatsache, dass PAK4 Trunktationsmutanten, welche nur noch die katalytische Untereinheit exprimieren, höhere katalytische Aktivitäten als das Volllängenprotein zeigen (Abo et al., 1998; Yang et al., 2001). Das weist darauf hin, dass PAK4 auf andere Weise intramolekular reguliert wird und dass die N-terminale Region möglicherweise als negativer Regulator der PAK4 Aktivität fungiert (Wells et al., 2002; Eswaran et al., 2007)

1.4.3.2 GTPase-abhängige Regulation

Wie oben beschrieben, weisen strukturelle Daten und biochemische Studien darauf hin, dass die Bindung von GTPasen an PAK1 zu einer Konformationsänderung der AID Domäne und damit zunächst zur Aufhebung der Autoinhibition und dann zur Autophosphorylierung führt, welche für die volle Kinaseaktivität erforderlich ist (Lei et al., 2000; Morreale et al., 2000; Zhao et al., 1998; Chong et al., 2001). Derzeit ist nachgewiesen, dass PAK1 an Rac1, Rac2, Rac3 und CDC42 binden und durch sie aktiviert werden kann. Auch die weniger gut erforschten GTPasen TC10, CHP und Wrch-1 können PAK1 binden und aktivieren (Neudauer et al., 1998; Aronheim et al., 1998; Tao et al., 2001). Andere GTPasen wie z.B. RhoA/B/C/E/G oder Mitglieder der Ras Gruppe interagieren nicht mit PAK. Bindung von CDC42-GTP an PAK4 zeigt keine Stimulation der Kinaseaktivität, aber eine Translokation von PAK4 an den Golgi Apparat (Abo et al., 1998). Ähnlich verhält es sich mit PAK5 und PAK6, deren Kinaseaktivität auch nicht zunimmt, obwohl sie zusätzlich an Rac binden (Pandey et al., 2002).

1.4.3.3 GTPase-unabhängige Regulation

Die Phosphotransferaseaktivität von PAK kann zusätzlich durch eine Vielfalt von bisher wenig erforschten GTPase-unabhängigen Mechanismen reguliert werden. Neben der Aktivierung von PAK2 während der Apoptose durch eine Caspase3-induzierte, limitierte Proteolyse (Benner et al., 1995; Rudel et al., 1997; Roig et al., 2001), spielen auch Adapterproteine wie Nck und Grb2 eine Rolle, durch die PAK1 Wachstumsrezeptor-vermittelt an die Membran rekrutiert und dann aktiviert wird (Bokoch et al., 1996; Puto et al., 2003). Dies geschieht durch die Phosphorylierung von Thr-423 durch PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase-1*) oder durch die Interaktion mit Membranlipiden wie z.B. Sphingosinen (King et al., 2000; Bokoch et al., 1998). Auch GIT1 (*G-protein-coupled receptor kinase interacting target 1*), welches indirekt über PIX an PAK bindet, kann PAK in Rho GTPase-unabhängiger Weise aktivieren (Loo et al., 2004) (s. 1.6).

In neueren Studien werden noch drei weitere negative Regulatoren der PAK Aktivität beschrieben. POPX1 und POPX2 (*partner of PIX*), zwei Proteinphosphatasen der PP2

Familie, können an PIX und PIX-PAK enthaltende Proteinkomplexe binden. Die Überexpression von POPX wirkt zellulären PAK1 Effekte entgegen (Koh et al., 2002). Die Tatsache, dass in diesem Multiproteinkomplex eine Phosphatase und eine Kinase räumliche Nähe aufweisen, verdeutlicht den schnellen, streng regulierten Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus der PAK Proteine (Zhan et al., 2003).

Akt ist ein weiteres Protein, das die PAK Aktivität durch Phosphorylierung am Ser-21 negativ reguliert. Durch diese weitere Phosphorylierung wird einerseits die Bindungsaffinität von Nck an PAK1 und damit die Rekrutierung und Aktivierung an der Zellmembran reduziert, andererseits aber auch die Kinaseaktivität gesteigert (Zhao et al., 2000; Tang et al., 2000).

1.4.4 PAK1 und PAK4 im Vergleich

Bezüglich des strukturellen Aufbaus gibt es zwischen PAK1 und PAK4 neben einigen Gemeinsamkeiten auch deutliche Unterschiede (s. auch 1.4.2). Zu nennen sind hier die Abwesenheit der AID und der *Acidic Region* im PAK4 Protein. Die PAK4 PBD ist nur zu ca. 40% identisch mit der von PAK1, dennoch kann PAK4 immer noch an aktivierte RhoGTPasen, wie z.B. CDC42-GTP oder Rac-GTP binden. Es fällt jedoch auf, dass PAK4 an Rac-GTP schwächer bindet als an CDC42-GTP (Abo et al., 1998). Auch die PAK4-Kinase Domäne zeigt nur eine 54%ige Übereinstimmung mit PAK1. Dies weist darauf hin, dass PAK1 und PAK4 möglicherweise unterschiedliche *downstream* Effektoren haben. Vor kurzem wurden zwei weitere Schlüssel-Aminosäure-Reste identifiziert, die wohl maßgeblich die Substratspezifität der Gruppe I bzw. II PAKs beeinflussen (Rennefahrt et al., 2007). Auch die Verteilung der konventionellen SH3 Bindemotive ist bei PAK4 andersartig, aber auch bezüglich der PIX-Bindung können Differenzen zwischen den beiden PAK Isoformen festgestellt werden, die offensichtlich funktionelle Auswirkungen haben. Webb et al. hat die Interaktion von β PIX mit PAK1 in glatten Muskelzellen nachgewiesen, wohingegen keine Interaktion zwischen PAK4 und PIX festgestellt werden konnte (Wells et al., 2002; Webb et al., 2005).

Die PAK4 Kinaseaktivität scheint nicht durch die Interaktion mit aktivierten RhoGTPasen, insbesondere CDC42, stimuliert zu werden (Abo et al., 1998). Vielmehr scheint CDC42 zur Translokation von PAK4 an den Golgi-Apparat beizutragen (Abo et al., 2000). Unabdinglich für die Aktivierung von PAK4 ist die Phosphorylierung von Ser-474. Es gibt Hinweise auf eine intramolekulare Inhibition von PAK4. So zeigen N-terminale Trunktationsmutanten eine stärkere Aktivität als das Wildtypprotein (Abo et al., 2000).

Es ist daher unklar, ob und in welcher Form PAK4 durch einen intramolekularen Schalter aktiviert wird, welcher durch die Bindung von CDC42/Rac aufgehoben wird. Abo et al. nahmen 1998 an, dass PAK4 konstitutiv aktiv ist. Diese Aussage steht im Gegensatz zur

These von Wells et al., die eine intramolekulare Inhibition der Kinaseaktivität für wahrscheinlich hält (Abo et al., 1998; Wells et al., 2002).

Auch hinsichtlich ihrer Funktion unterschieden sich PAK1 und PAK4. Die Expression von aktiviertem PAK4 führt, im Gegensatz zu PAK1, zu einer verminderten Anzahl an Stressfasern und fokalen Adhäsionen (Sells et al., 1997). Das scheint in Zusammenhang mit der Fähigkeit von PAK4 zu stehen, LIMK1 zu aktivieren und dadurch Aktinfilamente zu stabilisieren (Dan et al., 2001; Webb et al., 2005). Im Gegensatz zu PAK1 führt jedoch die Überexpression von PAK4 zu unkontrolliertem Wachstum und Zelltransformation. In diesem Zusammenhang wurde PAK4 auch in einer Reihe von Tumorzelllinien gefunden (Qu et al., 2001; Callow et al., 2002).

PAK1 zeigt in ruhenden Zellen eine zytosolische Lokalisation. Erst durch Stimulation, beispielsweise durch Wachstumsfaktoren, kommt es zur nahezu vollständigen Translokation an *membran ruffles* und Lamellipodien (Sells et al., 2000).

Im Gegensatz ist PAK4 in ruhenden Zellen in der perinukleären Region angeordnet. Und auch durch Interaktion mit aktiviertem Rac transloziert nur ein kleiner Anteil ans Lamellipodium, der Rest bleibt perinukleär. Die Interaktion mit CDC42 führt zur Translokation von PAK4 an das trans-Golgi Netzwerk.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass PAK4 zwar größtenteils gleiche Substrate wie PAK1 aufweist, jedoch deutliche Unterschiede beider Isoformen bzgl. der Regulation und Lokalisation auszumachen sind.

1.4.5 Funktion

Die PAK Proteinkinasen haben eine Vielfalt an Funktionen inne. Angefangen mit Regulation der Zytoskelettdynamik und Zellmotilität über Transkriptionsregulation bis hin zur Zellzyklus-Progression und Apoptose (s. Abb. 1-10; Eswaran et al., 2008).

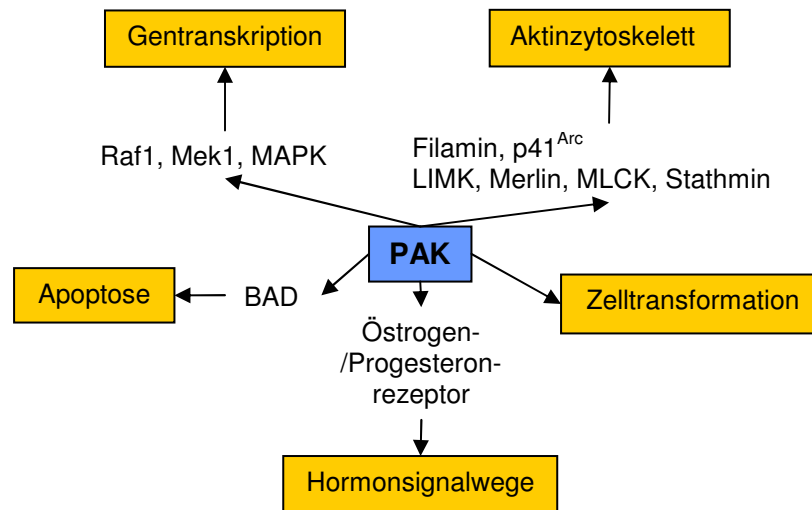


Abb. 1-10: Funktionen PAK

Bereits vor über 10 Jahren zeigte sich, dass die aktivierten RhoGTPasen CDC42 und Rac über die Aktivierung von PAK1 und 2 eine Untergruppe der JNK/p38 MAPKinasen stimulieren können (Coso et al., 1995; Minden et al., 1995; Bagrodia et al., 1995; Brown et al., 1996). Hier kommt es zunächst zur Phosphorylierung von Raf1, welches dadurch erst von Ras vollständig aktiviert werden kann (King et al., 1998; Diaz et al., 1997). Zudem phosphoryliert und aktiviert PAK1 Mek1, so dass Mek1 mit Raf1 interagieren kann (Catling et al., 1995; King et al., 1998). Dadurch wird der Erk Signalweg gestartet, MAP-Kinasen werden aktiviert und die Transkription gesteigert.

PAK Kinasen spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts. Die Phosphorylierung von Filamin, p41^{Arc}, LIMK, Merlin, MLCK (*Myosin light chain kinase*) und Stathmin steigert über verschiedenste Wege die Aktin- und Tubulinpolymerisation.

In glatten Muskelzellen führt die CDC42/Rac induzierte PAK Aktivierung zu teils gegensätzlichen und noch nicht endgültig verstandenen Reaktionen. So kommt es einerseits PAK4-induziert durch die Verminderung der MLCK Aktivität zu einem verminderten *cell spreading* (Chew et al., 1998; Sanders et al., 1999). Dem entgegen steht die Rho vermittelte Steigerung der Kontraktilität, vermehrte Expression von Stressfasern sowie *cell spreading*. Rho führt zu einer p160-RhoKinase vermittelten Phosphorylierung der leichten Myosinketten und zudem zu einer Inaktivierung der MLC Phosphatase (Amano et al., 1996; Kimura et al., 1996). Es resultiert ein großer Pool an phosphorylierten leichten Myosinketten. Diese stellen die Grundlage für die vermehrte Kontraktilität zur Bildung von Stressfasern und *cellspreading* dar.

Ein für diese Arbeit sehr grundlegender PAK-vermittelter Signalweg ist die LIMK- und Cofilin-abhängige Aktindepolymerisation und Aktinfilamentbildung. Hier führt die CDC42/Rac vermittelte PAK-Aktivierung zur Phosphorylierung und Aktivierung der LIMK-1

(Edwards et al., 1999; Ahmed et al., 2008). Es kommt zur Phosphorylierung und damit zur Inaktivierung von Cofilin, einen F-Aktin-depolymerisierenden Faktor, was zu einem erhöhten Aktinumsatz führt. Dieser Aktinfilament-Zerfall zeigt sich in der vermehrten Ausbildung von Lamellipodien und *ruffles* (Dan et al., 2001).

Für eine normale Zellentwicklung ist die Balance zwischen Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Migration und Zelltod unabdingbar. Störungen dieses Gleichgewichtes führen zur malignen Entartung mit unkontrolliertem Zellwachstum. Neuere Untersuchungen zeigen, dass im Rahmen der Tumorprogression PAK als Schlüsselenzym dereguliert ist. Beispielsweise ist die PAK4 Expression in vielen Tumorzelllinien um bis zu 78% erhöht, wobei hier die intakte Kinaseaktivität eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Callow et al., 2002; Vadlamudi et al., 2003). So führt die Expression von aktiviertem PAK4 oder PAK1 zu einem Verlust an Streßfasern und Fokalen Adhäsionen und damit zur Ablösung der Zellen. Es zeigten sich auch Defekte hinsichtlich *cell spreading* und der Bindung der Zellen an ihr Substrat, was den Zellen eine vermehrte Motilität verleiht und damit die Grundlage der Metastasierung legt (Qu et al., 2001; Vadlamudi et al., 2000).

Interaktionen mit Hormonrezeptoren wurden bisher noch sehr spärlich untersucht. Bislang wurde nur für PAK6 eine Interaktion mit dem Androgenrezeptor nachgewiesen (Yang et al., 2001). So kommt es in Anwesenheit von Rezeptor und Ligand zur Translokation von PAK6 in den Nukleus. Durch die Interaktion mit PAK6 können Transkriptionskoaktivatoren nicht mehr an den Rezeptor binden, folglich kann die Androgenrezeptor-vermittelte Transkription nicht mehr initiiert werden. Erst kürzlich wurde die Phosphorylierung und damit Aktivierung des Östrogenrezeptors ER-alpha durch PAK1 in Brustkrebszellen nachgewiesen, was zu vermehrten Tumorwachstum führt (Holm et al., 2006).

Hinsichtlich ihrer Funktion in der Apoptose zeigt sich in der PAK Familie eine deutliche Heterogenität. PAK2 wird von Caspase3, einem apoptotischen Enzym, proteolytisch aktiviert und scheint dann für die morphologischen Veränderungen während der Apoptose mit verantwortlich zu sein (Rudel et al., 1997). Im Gegensatz dazu stehen PAK1 und PAK4, welche beide anti-apoptotische Funktionen haben und damit zytoprotektiv sind. Aktiviertes PAK1 kann über die Phosphorylierung und damit Inhibierung von Bad, welches den apoptotischen Zyklus einleitet, Zellen vor der Apoptose bewahren (Schurmann et al., 2000). PAK4 wirkt auf mehreren Wegen protektiv (Gnesutta et al., 2001). Zum einen verzögert aktiviertes PAK4 die Aktivierung der Caspase. Zum anderen phosphoryliert

PAK4 Bad selbst und erleichtert zusätzlich die Bad Inhibition durch Phosphorylierung von Akt.

1.5 PIX (*PAK-interacting exchange factor*)

1.5.1 Allgemeines

Die Mitglieder der PIX-Familie spielen in zweierlei Hinsicht eine wichtige Rolle für die Rho-GTPase-vermittelte Aktinzytoskelett-Regulation. PIX wurde erstmals im Jahre 1997 als ein *src homology domain 3* (SH3) enthaltendes Protein in der Plattenepithel-Karzinomzelllinie A431 identifiziert. Es existieren zwei sehr ähnliche Isoformen, α PIX, auch p90-Cool2 genannt, und β PIX bzw. p50-/p85-Cool1, welche von den Genen *ARHGEF6* bzw. *ARHGEF7* kodiert werden. Für β PIX konnte eine Vielzahl von Spliceprodukten identifiziert werden, wohingegen bisher nur eine einzige Proteinform für α PIX beschrieben worden ist (Kim et al., 2000; Kim and Park, 2001; Rhee et al., 2004). Es gibt jedoch auch Hinweise auf mehrere α PIX Splicevarianten (Kutsche unpublished).

α und β PIX gehören der Dbl (*diffuse B-cell lymphoma*) Familie an, einem *upstream* Aktivator von RhoGTPasen. Hieraus leiten sich z. T. auch die Funktionen ab. So ist PIX ein GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) der kleinen RhoGTPasen CDC42 und Rac1. α PIX kann zum einen als *upstream* Aktivator von Rac1, zum anderen als *downstream* Effektor von CDC42 fungieren (Baird et al., 2005). PIX ist aber auch als PAK-bindendes Protein maßgeblich an der Translokation an die Zellmembran und an der Aktivierung von PAK beteiligt. Die verschiedenen PIX Isoformen zeigen unterschiedliche Funktionen hinsichtlich der PAK Aktivierung, welche in Tabelle 1-2 zusammengefasst sind (Feng et al., 2002).

Tabelle 1-2: Übersicht der PIX-Isoformen

p50-Cool-1	β -PIX	Hemmung der CDC42/Rac stimulierten PAK Aktivität
p85-Cool-1	β -PIX	Permissiver Effekt auf Cdc42/Rac stimulierte PAK Aktivität
p90-Cool-2	α -PIX	Starke PAK Aktivierung

1.5.2 Aufbau

α PIX und β PIX zeigen eine sehr ähnliche Domänenstruktur, welche sich nur durch das zusätzliche Vorhandensein einer CH (*calponin homology*) Domäne im α PIX Protein unterscheidet (s. Abb. 1-11). Die CH Domäne wird für die Lokalisation von α PIX an die Zellmembran benötigt und ist zugleich Bindungsort von β -Parvin, einem Protein in fokalen Adhäsionen (Rosenberger et al., 2003). Auch für die Gehirnentwicklung scheint die CH

Domäne eine entscheidende Rolle zu spielen, denn Untersuchungen von Patienten mit X-chromosomaler spezifischer mentaler Retardation zeigen eine um 28 Aminosäuren verkürzte CH Domäne (Kutsche et al., 2000). Es folgt weiter die N-terminale SH3 (*src homology 3*) Domäne, welche wichtig für die Bindung von PAK und Cbl-b ist und damit die Translokation von PAK an die Zellmembran vermittelt. Weiterhin sind die zentralen DH (*Dbl homology*) und PH (*pleckstrin homology*) Domänen zusammen mit der zuvor beschriebenen SH3 Domäne verantwortlich für die Bindung von Calpain4. In C-terminaler Richtung folgen die GBD (*GIT1-binding domain*) Domäne, welche die Interaktion mit GIT1 vermittelt und die CC (*coiled coil*) Domäne, die für die Bildung von PIX-Homo- und Heterodimeren von Bedeutung ist (Kim et al., 2001; Koh et al., 2001).

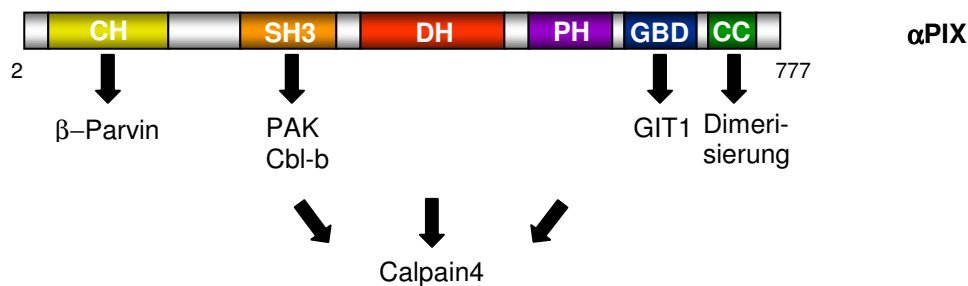


Abb. 1-11: αPIX Domänenstruktur und Interaktionspartner

Das Vorhandensein von zwei für RhoGTPase-GEFs sehr markanten Strukturen, jeweils einer konservierten DH und PH Domäne, legt zunächst nahe, dass PIX als GEF für Rac1 und CDC42 fungiert. Dennoch zeigt sich im Gegensatz zu *in vitro* Versuchen nur eine geringe GEF Aktivität *in vivo* (Koh et al., 2001; Manser et al., 1998). Feng et al. zeigte, dass das Vorhandensein von αPIX Mono- bzw. Dimeren von entscheidender Bedeutung für die spezifische GEF-Aktivität des Proteins ist (Feng et al., 2004). So fungieren αPIX-Monomere als GEF für sowohl Rac1, als auch für CDC42. Kommt es jedoch über die CC Domänen zweier αPIX Monomere zur Dimerisierung, so kann die GEF-Aktivität nur noch gegenüber Rac1 nachgewiesen werden. Die Dissoziation- und damit Reaktivierung der GEF Aktivität für CDC42 eines Dimers kann wiederum durch die Bindung von Gβγ-Komplexen zusammen mit PAK4 an die SH3 Domäne bewerkstelligt werden (s. Abb. 1-12; Feng et al., 2004). Das zeigt einen neuen Weg, wie spezifische extrazelluläre Signale durch fein abgestimmte Regulierung des Monomer-Dimer Gleichgewichts bestimmen können, welcher der beiden Signalwege (Rac- und/oder CDC42) aktiviert wird. Baird et al. zeigte einen allosterischen Regulationsmechanismus durch Bindung von aktiviertem CDC42, wodurch die Rac-spezifische GEF Aktivität noch verstärkt wird (Baird et al., 2005). Im Gegensatz dazu führt die Bindung von aktiviertem Rac1 über ein negatives Feedback zu einer deutlichen Hemmung der Rac-spezifischen GEF Aktivität.

1.5.3 Funktion

PIX Proteine sind an der Integrin-abhängigen Signaltransduktion und damit an der Regulation der Zelladhäsion beteiligt. Laut der aktuellen Datenlage spielt PIX sowohl bei der Generierung, wie auch bei der Auflösung von fokalen Komplexen eine Rolle. Als GEF für CDC42 und Rac ist es an der F-Aktin Polymerisierung beteiligt (s. 1.2.1.2). Weiterhin fungiert es als Adapterprotein für PAK und ist als Teil eines Multiproteinkomplexes bestehend aus GIT-PAK- und Paxillin für die Translokation an fokale Komplexe zuständig (s. 1.7). Cbl-b kompetitiert mit PAK um die SH3 Bindestelle. Es bewahrt EGF vor dem Abbau durch Ubiquitin-abhängige Signalwege (Flanders et al., 2003; Wu et al., 2003). Auch hinsichtlich der frühen Integrin-*cluster*, Vorstufen der fokalen Komplexe, zeigt PIX eine duale Rolle. Einerseits aktiviert PIX, wie oben beschrieben, RhoGTPasen und führt zum Aktinaufbau, andererseits vermittelt es durch die Aktivierung von Calpain4 den Abbau von sog. Fokalen Adhäsions Proteinen wie α -Actinin und Spectrin (Übersicht bei Rosenberger et al., 2005). Durch die Interaktion mit β -Parvin kann PIX die integrinvermittelte Zelladhäsion während der Zellmigration und des Zellwachstums regulieren (s. Abb. 1-13; Übersicht bei Rosenberger et al., 2005).

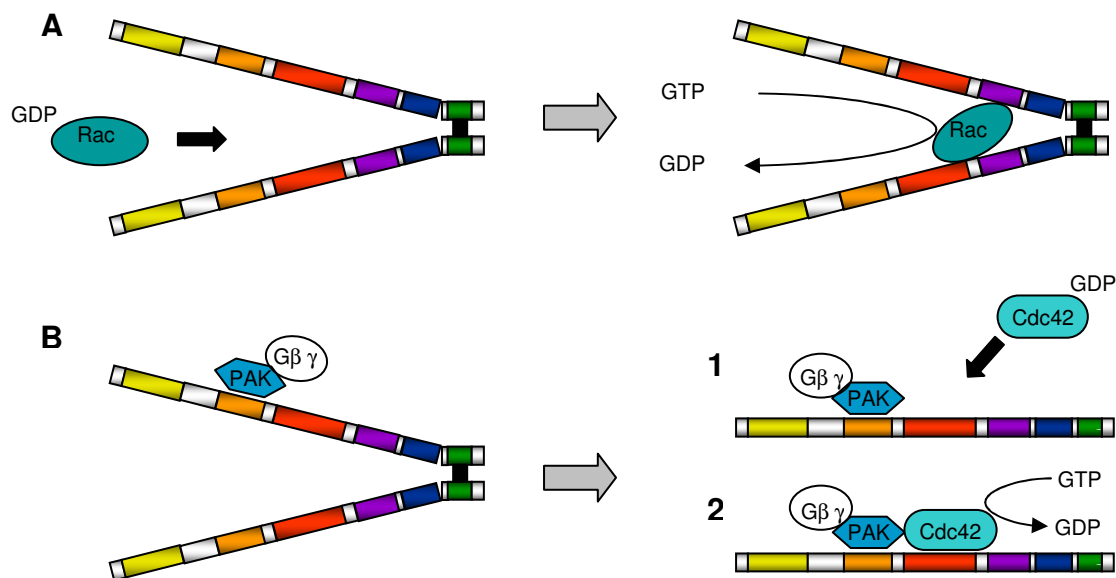


Abb. 1-12: Regulationsmechanismen der α PIX-GEF Aktivität

- A)** Die Bindung von Rac-GDP an das α PIX Dimer erfolgt zum einen an die DH Domäne eines Monomers und zum anderen an die RSID (*Rac specific interaction domain*)-einem Teil der PH Domäne- des anderen Monomers.
- B)** Die Bindung von PAK-G $\beta\gamma$ Komplexen an die SH3 Domäne führt zur Dissoziation des α PIX Dimers und zur Bindung (1) mit anschließender Aktivierung von GDP-Rac oder GDP-CDC42 (2).

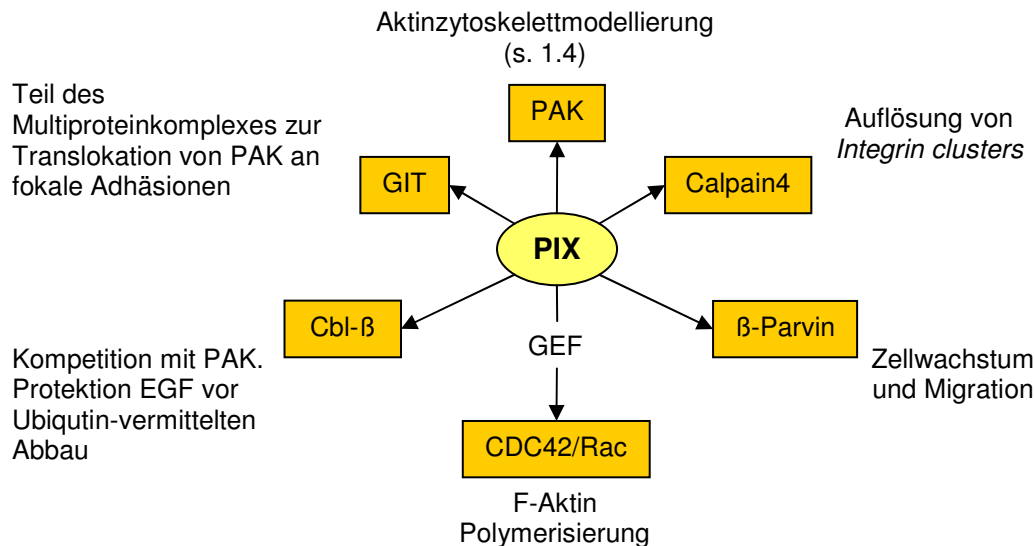


Abb. 1-13: PIX Interaktionspartner und deren Funktionen

1.6 GIT (*G-protein-coupled receptor kinase interacting target*)

GIT als Bestandteil des Multiproteinkomplexes dient in erster Linie der Translokation von PAK und PIX an fokale Adhäsionen. GIT Proteine wurden erstmals 1998 als *G-protein coupled receptor kinase* Interaktoren entdeckt (Premont et al., 1998). Neben dem am meisten verwendeten Namen GIT, existieren noch viele Synonyme: Cat (*Cool-associated tyrosine phosphosubstrate*) (Bagrodia et al., 1999), p95PKL (*p95 paxillin kinase linker*) (Turner et al., 1999), ADP-ribosylation factor (Arf)-GAP-putative, (*PIX-interacting, Paxillin-interacting protein*) (Paris et al., 2003). Derzeit sind zwei GIT Isoformen bekannt, GIT1 und GIT2, die ein breites Expressionsmuster zeigen. Die höchsten Konzentrationen finden sich im Hoden (Paris et al., 2002; Premont et al., 1998 und 2000).

Die Hauptfunktion der GIT Proteine scheint die Regulation der Zytoskelettdynamik während der Zellausbreitung und -migration zu sein. Während dieser Prozesse zeigen sich eine vermehrte GIT Phosphorylierung und Translokation aus dem Zytoplasma an fokale Adhäsionen (Bagrodia et al., 1999; Lamorte et al., 2003). Weitere Funktionen bestehen in der Regulation der Rezeptorinternalisierung durch *Clathrin-coated pits* und dem Membran-*trafficking* zwischen der Zelloberfläche und den Endosomen (Hoefen and Bradford, 2006).

GIT Proteine zeigen eine komplexe Multidomänen-Proteinstruktur und können eine Vielzahl von Proteinen binden. Am N-terminalen Ende findet sich die ARF-GAP (*ARF-GTPase-activating*) Domäne, welche v.a. durch Interaktion mit ARF6 die Lokalisierung von GIT an die Zellperipherie und das Membran-*trafficking* vermittelt (Matafora et al., 2001). Es folgen weiter drei Ankyrinrepeats (ANK); hier scheint v. a. die erste Sequenz für die GIT-Lokalisation an Endosomen von Bedeutung zu sein (Di Cesare et al., 2000; Paris

et al., 2002). Die SHD (*Spa2-homology-domain*) zeigt Interaktionen mit mehreren Proteinen, u.a. α PIX und p85 β PIX, woüber GIT auch mit PAK und den kleinen GTPasen Rac1 und CDC42 interagieren kann (Feng et al, 2002; Loo et al., 2004). Das Leucin-*zipper* Motiv innerhalb der nachfolgenden *Coiled-coil* Domäne vermittelt die Homo- bzw. Heterodimerisierung, welche als Basis für die Bildung von GIT-PIX Oligomeren dient. Diese Oligomere sind wichtig für die Rac1/CDC42 vermittelte Aktivierung der PAK Kinaseaktivität: Durch die Bindung von Rac-GTP bzw. CDC42-GTP an inaktives PAK kommt es zu einer Konformationsänderung, die die Interaktion mit dem GIT-PIX-Oligomer über eine direkte PIX Bindung zulässt (Brown et al., 2002). Auch hohe lokale PAK-Konzentrationen an GIT-PIX Komplexen erlauben eine GTPase unabhängige Aktivierung durch Autophosphorylierung (Loo et al., 2004). Die am nächsten zum C-terminalen Ende gelegene *Paxillin-binding site* (PBS) vermittelt die Lokalisation von GIT an Fokale Komplexe (Nayal et al., 2006; Schmalzigaug et al., 2007). Es bestehen Hinweise, dass diese Bindedomäne erst durch die Bindung von PAK freigegeben wird (Brown et al., 2002, Di Cesare et al., 2000; Manabe et al., 2002; Matafora et al., 2001; Paris et al., 2002).

1.7 PAK-PIX Interaktion und PAK-PIX-GIT Komplex

Wie bereits erwähnt, ist PIX auch für die Translokation von PAK an fokale Adhäsionen und Membranprotrusionen von Bedeutung (Premont et al., 2004; Botrugno et al., 2006). Dies geschieht in einem Proteinkomplex, der aus mehreren Komponenten besteht (s. Abb. 1-14).

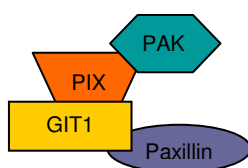


Abb. 1-14: GIT1-PIX-PAK-Paxillin-Komplex

Im Multiproteinkomplex erfolgt die PIX-PAK Bindung über die PIX-SH3 Domäne an eine prolinreiche Region des PAK Proteins. Interessanterweise scheint sich die Bindungsaffinität um das 6-fache zu vermindern, wenn sich PAK4 im aktivierten Zustand befindet (Mott et al., 2005). Auf der anderen Seite ist Paxillin als Hauptkomponente in fokalen Adhäsionen an deren Regulation und an assoziierten Signalkaskaden beteiligt (Brown and Turner, 2004; Mayhew et al., 2006). Die Bindung des Multiproteinkomplexes erfolgt über GIT1 an Paxillin in Fokalen Adhäsionen.

Demnach rekrutiert PIX PAK an den Proteinkomplex, der wiederum an das *leading edge* von Membranprotrusionen lokalisiert (s. Abb. 1-14). So kann PAK vor Ort die

Aktinreorganisation regulieren und dadurch den *Turnover* kontrollieren. PIX hat als GEF für Rac und CDC42 zusätzlich die Aufgabe, Rac an diesen Orten zu aktivieren (Jones and Katan, 2007). Dieser Multiproteinkomplex ist somit ein Teil eines Recyclingkreislaufs, der im Rahmen der Rac-vermittelten Aktinreorganisation am *leading edge* stattfindet.

1.8 Medizinische Relevanz podosomaler Strukturen und ihrer Regulatoren in Makrophagen

Es ist bekannt, dass genetische Defekte zu einer Beeinträchtigung der Makrophagen-Funktion führen, die sich sowohl in Immundefekten, als auch in inadäquaten oder überschießenden Immunreaktionen widerspiegeln kann. Zu nennen sind hier Erkrankungen wie Asthma, Psoriasis, Arthritis oder auch Multiple Sklerose. In den letzten Jahren wurde die Beteiligung von Makrophagen bei der Arterioskleroseentstehung und Plaqueruptur nachgewiesen. So kommen Makrophagen schon in den Frühstadien der Erkrankung als Schaumzellen in der Intima des Gefäßendothels vor (Thai et al., 1995). Durch die ständige Phagozytose modifizierter Lipoproteine und Zelldebris sowie durch die Stimulation von glatten Muskelzellen tragen die an Größe zunehmenden Schaumzellen wiederum zum Plaquewachstum und Gefäßlumenverengung bei. Durch die Sekretion von Matrix-Metalloproteasen, Sauerstoffradikalen und Zytokinen wird einerseits die Kollagenhaltige Plaquekappe angelöst, was letztenendes zur Plaqueruptur führt und thromboembolischen Ereignissen den Weg bahnt. Andererseits kommt es Zytokin-vermittelt zur Entzündungsreaktion (reviewed by Schrijvers et al., 2006; Rajavashisth et al., 1999). Durch Stimulation der Angiogenese, extrazellulären Matrixabbau durch Metalloproteasen und die Sekretion von Wachstumsfaktoren sind Makrophagen auch in die Tumorprogression und Metastasierung integriert (Condeelis and Pollard, 2006). Hierbei kommt den Podosomen, als spezifischen Adhäsionsstrukturen und Matrixdegeneratoren monozytärer Zellen (hinsichtlich der erworbenen Invasivität von Makrophagen) und weiterer Zellentypen (z.B. Endothelzellen, glatte Muskelzellen) wahrscheinlich eine wichtige Rolle zu. Weiterhin finden sich auch in src-Protoonkogen-transformierten Fibroblasten und Krebszellen Podosomen-verwandte Strukturen (Invadopodien). Dies legt die Vermutung nahe, dass Podosomen eine funktionelle Anpassung, insbesondere migratorischer Zellen, auf äußere Reize darstellen. Diese kommen einerseits im physiologischen Rahmen, beispielsweise bei der chemotaktisch-vermittelten Transmigration aus dem Blutgefäßsystem vor (Petri and Bixel, 2006; Carman et al., 2007). Andererseits sind sie auch in pathologischer Hinsicht bei der Invasion von Krebszellen beteiligt (Linder et al., 2003; Buccione et al., 2004; Yamaguchi et al., 2006). Eine gestörte monozytäre Migrations- und Polarisationsfähigkeit liegt beispielsweise beim

Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) vor. Makrophagen von WAS Patienten zeigen keine Podosomen (Linder et al., 1999) und es wurden auch Störungen der zellulären Funktion von Osteoklasten, dendritischen Zellen und B-Zellen gefunden (Calle et al., 2004; Westerberg et al., 2005). Auch bei Patienten mit chronisch myeloider Leukämie (CML) konnte eine reduzierte bis völlig fehlenden Podosomenbildung und eine damit einhergehende reduzierte Migrationsfähigkeit dendritischer Zellen nachgewiesen werden (Dong et al., 2003).

Vor dem Hintergrund der bereits beschriebenen Beteiligung podosomal Strukturen sowie deren Regulation bzw. Fehlregulation bei Krankheiten ist den PAK Kinasen eine wichtige Rolle zuzusprechen. So ist bekannt, dass gerade die Isoformen PAK1 und PAK4 von sehr großer Bedeutung bei der Entstehung und Regulation von invasiven Tumorzellen sind. Es wurde gezeigt, dass PAK4 *levels* in vielen Tumorzelllinien, wie beispielsweise des Colon- oder Pankreas-Karzinoms, erhöht sind (Ahmed et al., 2008). Hierbei scheint gerade die vermehrte PAK4 bzw. PAK1 Kinaseaktivität für das Ras-vermittelte *anchorage-independent* Wachstum in Colon-Karzinom- bzw. Mamma-Karzinom-Zellen verantwortlich zu sein (Callow et al., 2002). So führt die PAK4-vermittelte Aktivierung zweier *pro-survival* Signalwege, NF κ B und ERK, dazu, dass entartete Zellen nicht zugrunde gehen (Gnesutta et al., 2001; Li et al., 2005). Desweiteren weisen neueste Untersuchungen auf ein PAK1 induziertes Wachstum der Mamma-Karzinomzellen durch Aktivierung des Estrogen alpha Rezeptors (*ERalpha*) hin, was dadurch auch den Therapieerfolg mit Antiöstrogenen wie Tamoxifen schmälert (Holm et al., 2006).

Über die Podosomenregulation hinaus ist PAK4 auch für andere zelluläre Funktionen von Bedeutung. In diesem Zusammenhang konnte eine Fehlregulation von PAK4 beispielsweise bei verschiedenen Krankheitsprozessen nachgewiesen werden. Eine regelrechte PAK4 Expression ist essentiell für embryonale Lebensfähigkeit und regelhafte Entwicklung des Nervensystems (Qu et al., 2003). PAK4 *knock-out* Mäuse sterben bereits im Embryonalstadium und weisen neben einem nicht funktionstüchtigen Herz auch Defekte bezüglich der neuronalen Entwicklung auf. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass PAK eine wichtige Rolle bei der Alzheimerkrankheit und anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu spielen scheint: die PAK-Aktivität ist in Neuronen dieser Patienten deutlich reduziert, was durch eine Abnormalität im Cofilinmolekül eine defekte Aktinregulation durch Drebrin zur Folge hat. Auch die pharmakologische PAK-Inhibition im Mausmodell konnte über den gleichen Mechanismus Gedächtnisstörungen wie sie bei der Alzheimer Krankheit auftreten hervorrufen (Zhao et al., 2006). Neueste Untersuchungen zeigen, dass PAK die Gefäßpermeabilität im Rahmen der Atherosklerose beeinflusst. So führen zum einen ein veränderter Blutfluß zum anderen aber auch oxidiertes LDL und Zytokine zu einer PAK Aktivierung und Rekrutierung an

Zell-Zell-Verbindungen. Dadurch nimmt die Permeabilität des Gefäßendothels zu, was durch die verstärkte LDL-Einlagerung wiederum zum Plaquewachstum führt (Orr et al., 2006; Stockton et al., 2007). Zurzeit wird evaluiert, inwiefern durch die Hemmung der PAK-Lokalisation oder der PAK-Aktivierung ein Faktor der Atheroskleroseprogression kontrolliert werden könnte.

Die genaue Erforschung der podosomalen Funktionen sowie ihrer Regulation insbesondere durch die PAK-PIX-vermittelte Signaltransduktion dürfte somit interessante Einblicke in immunologische Prozesse, in die Tumorzellmigration und Metastasierung geben. Damit könnte eine wichtige theoretische Grundlage für therapeutische Überlegungen geschaffen werden.

1.9 Fragestellung

Podosomen sind Aktin-reiche Adhäsionsstrukturen, die von monozytären Zellen, insbesondere von adhärennten Makrophagen ausgebildet werden und im Zusammenhang mit der zellulären Migration und Invasion stehen. Die Podosomenregulation erfolgt u.a. durch RhoGTPase-vermittelte und Aktin-regulatorische Signalwege (Lehto et al., 1982; Chellaiah et al., 1998; Linder et al., 1999; Tatin et al., 2006). Für alle drei Hauptvertreter der RhoGTPasen, RhoA, Rac1 und CDC42, wurde ein Einfluß auf die Podosomenregulation nachgewiesen und v.a. die Wichtigkeit des CDC42-(N-)WASP-Arp2/3 Weges für die podosomale Aktinnukleation unterstrichen (Linder et al., 1999; Chellaiah et al., 2000; Burns et al., 2001; Berdeaux et al., 2004). Derzeit ist jedoch noch nicht eindeutig verstanden, wie diese Signalwege die hoch lokalisierten Änderungen der Podosomenformation und -dynamik induzieren können. Bekannt ist, dass Signalwege, die von den RhoGTPasen CDC42 und Rac kontrolliert werden, maßgeblich an der Zytoskelett-Reorganisation beteiligt. Über die Rolle spezifischer *downstream* Effektoren wie Cofilin, sowie Mitglieder der PAK-Familie, die zu den Haupteffektoren der RhoGTPase gehören (Abo et al., 1998; Adam et al., 1998; Edwards et al., 1999), ist in diesem Zusammenhang allerdings wenig bekannt. Deshalb ist diese Arbeit vorwiegend auf die Untersuchung der Rolle von Cofilin, PAK Kinasen und deren Interaktoren hinsichtlich der Podosomen-Regulation ausgerichtet (s. Abb. 1-15).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen im Hinblick auf die Podosomen-Regulation untersucht werden:

- Welche Rolle spielt PAK als RhoGTPase Effektorprotein *upstream* von Cofilin hinsichtlich der Podosomen-Formation?
- Welche der sechs PAK-Isoformen ist die physiologische Isoform in primären humanen Makrophagen?
- Können PAK Proteine an Podosomen lokalisiert werden?
- Hat PIX als Interaktor von PAK einen Einfluß auf die Podosomen-Formation/Regulation?
- Interagieren PAK und PIX auch in primären humanen Makrophagen?
- Welche Domänen von PAK bzw. PIX sind für mögliche Effekte auf Podosomen und Interaktionen mit anderen Proteinen verantwortlich?

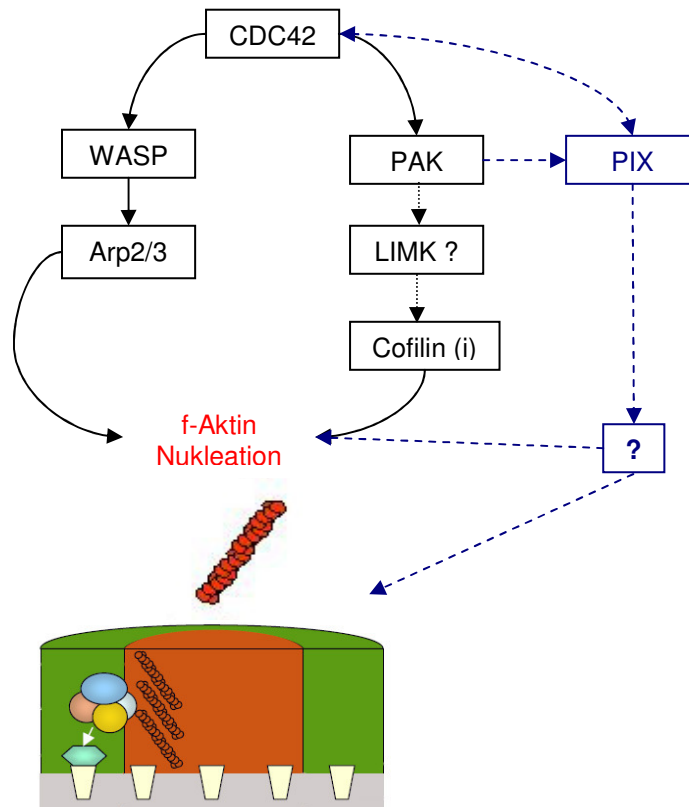


Abb. 1-15: Signalwege der Aktinregulation

Zusammenstellung einiger ausgewählter bekannter Signalwege mit Schwerpunkt der F-Aktinnukleation. Schwarz gestrichelte Linien: Noch nicht für Podosomen nachgewiesene, aber vermutete Zusammenhänge. Blau-gestrichelte Linien: Forschungsgegenstand dieser Arbeit (modifiziert nach Linder and Kopp, 2005).

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Arbeiten mit *E. coli*

Allgemeines

Für die Kultur von *Escherichia coli* wurden alle Medien mit deionisiertem und gefiltertem (Millipore-Ionenaustauscher) Wasser zubereitet. Nach Zugabe der Komponenten wurden die Medien bei 120°C, 1,5 bar, 45 min autoklaviert (Bioclav, Fa. Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen). Hitzelabile Substanzen, wie Glukose oder Antibiotika, wurden steril filtriert und nach Abkühlen der autoklavierten Medien auf ca. 50°C zugegeben. Plastikgefäße wurden steril vom Hersteller bezogen, Glasgefäße vor dem Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert.

Kultivierung von *E. coli*

Der im Labor verwendete Bakterienstamm war *Escherichia coli* DH5 α : F- ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rK⁺,mK⁺) *phoA supE44* λ -*thi-1 gyrA96 relA1* (Fa. GibcoBRL, Paisley, Großbritannien). Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37°C in zuvor autoklaviertem (20 Min; 121°C; Bioclav, Fa. Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen) LB Medium. Bakterien, die mit einem Resistenzplasmid transformiert waren, wurden in einem Selektivmedium mit 100 μ g/ml Ampicillin (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) oder 30 μ g/ml Kanamycin (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) gezogen. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C in LB-Medium mit 20% Glycerol nach zuvorigem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff.

LB-Agarplatten mit dem jeweiligen selektiven Antibiotikum wurden mit Hilfe einer Impföse mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 37°C über Nacht bebrütet. Kleine Volumina Flüssigkultur (5-10 ml LB-Medium) wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Für größere Volumina (100 ml-1000 ml) wurde zunächst eine Starterkultur angelegt und nach 8 h in einer Verdünnung von 1:500-1:1000 zu LB-Medium gegeben und 37°C schüttelnd inkubiert.

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde in Plastikküvetten gegen unbeimpftes Medium bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektrophotometer (Fa. Kontron Instruments, Watford, Großbritannien) bestimmt. Eine OD600-Einheit entspricht hierbei ungefähr einer Konzentration von 10⁸ Zellen/ml bei OD600 < 1.

Kulturmedien:

SOB Flüssigmedium: Fertigmischung, laut Herstellerangaben in H₂O dest. gelöst

SOB Agarplatten: 25 mM SOB Fertigmix wurden pro 100 mm Platte gegossen

SOB/Glycerin: SOB mit 40 vol% Glycerin

SOC Flüssigmedium: SOB mit 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose

2.1.2 Transformation von Plasmiden

2.1.2.1 Herstellung elektrokompetenter *E.coli DH5α*

1 ml einer Übernachtskultur von *E.coli DH5α* wurde in 1 l LB-Medium gegeben, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 schüttelnd inkubiert und anschließend durch zehnminütige Zentrifugation bei 4300 x g (Zentrifuge Centricon H-401, Kontron Instruments, Watford, Großbritannien; Rotor A8.24) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 1 l eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 0,5 l kaltem Wasser aufgenommen, die Zentrifugation wiederholt, das verbleibende Sediment in ca. 20 ml 10% Glycerol resuspendiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die so behandelten Zellen wurden schließlich in 2 ml 10% Glycerol aufgenommen, in Aliquots zu 50 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.1.2.2 Transformation mittels Elektroporation

Die elektrokompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 2-5 µl der zu transformierenden DNA-Lösung mit den aufgetauten Bakterien vermischt und die Suspension in vorgekühlte 2 mm-Elektroporationsküvetten (Fa. equibio, Ashford, Großbritannien) pipettiert. Die Transformation erfolgte bei 200 Ω, 25 µF und 2,5 kV im Gene-Pulser II (Fa. Biorad, München). Danach wurden die Zellen in 1 ml kaltem LB-Medium mit 1% Glucose aufgenommen, für 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert, auf Selektivagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.2.3 Herstellung hitzekompetenter Bakterien

100 ml LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur von *E. coli DH5α* beimpft und bei 37°C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Die Bakterien wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 1900 x g bei 4°C geerntet. Das Sediment wurde in 50 ml eiskaltem 100 mM MgCl₂ resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert und in 50 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ aufgenommen. Nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden in 2 ml 100 mM CaCl₂, gelöst und für 24 h bei 4°C inkubiert, mit 0,5 ml Glycerin und 2,5 ml 100 mM CaCl₂ supplementiert und in 100-µl Aliquots bei -70°C gelagert.

2.1.2.4 Hitzeschocktransformation

Bei Verwendung des Alligator-DNA-Ligations-Kits (Fa. Genaxxon, Stafflangen, Deutschland) wurden die hitzekompetenten Bakterien nach Herstellerangaben transformiert.

2.1.3 Arbeiten mit primären menschlichen Zellen

2.1.3.1 Allgemeines

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (Fa. BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen) mit Einmal-Kunststoffkulturflaschen (Fa. Corning, Corning, USA) durchgeführt. Monozyten wurden auf sterilen unbeschichteten 6-well Platten (Fa. Sarstedt, Newton, USA) kultiviert.

Die Kultur primärer humaner Makrophagen erfolgte in sterilem, endotoxinfreiem RPMI Medium, dem 20% autologes, steril filtriertes Serum, sowie Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) beigegeben wurden. Die Kultur erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit. Alle Zellkulturgefäße waren aus Kunststoff und wurden vom Hersteller steril und endotoxinfrei bezogen.

Sofern nicht bereits als sterile Lösungen erworben, wurden alle Medien, Lösungen und Supplemente für die Zellkultur mit einem an eine Vakuumpumpe angeschlossenen 0,2-µm Filtermembranfiltrationssystem (Stericup; Fa. Millipore, Bedford, USA) oder mit 0,2-µm Spritzenfilter sterilisiert.

Für adhäsives Wachstum von HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) wurden alle Zellkulturflaschen, Petrischalen und Deckgläschen mit 75 µg/ml steriler Kollagenlösung G (Fa. Biochrom KG, Berlin) gelöst in PBS (Dulbecco's PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, Fa. PAA, Linz, Österreich) für 15 min bei RT beschichtet.

2.1.3.2 Isolation primärer humaner Makrophagen aus menschlichem Blut

Primäre humane Monozyten/Makrophagen wurden wöchentlich frisch aus peripherem humanem Blut isoliert. Die Blutabnahme erfolgte in 50 ml-Spritzen, in die zuvor je 500 µl (= 2500 I.E) Heparin (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland) vorgelegt wurde.

Zur Isolation wurden 15 ml Ficoll-(Lymphozyten-Separations-)Lösung (Fa. Promo Cell, Heidelberg) vorsichtig mit 12,5 ml Blut überschichtet, nicht gemischt. Zur Ausbildung des gewünschten Ficollgradienten, wurde die überschichtete Lösung bei 460 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge pico; Heraeus (Fa. Osterode, Deutschland)). Es war darauf zu achten, dass die Zentrifuge am Ende nicht zu stark gebremst wurde, da sich sonst der Gradient vermischen würde. Die Schicht mit den mononukleären Zellen (s. Abb. 2-1) wurde abpipettiert, jeweils 2 Proben vereinigt, mit kaltem RPMI 1640 (Fa.

Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 460 g und 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in kaltem RPMI gewaschen, erneut zwei Proben vereinigt, mit kaltem RPMI auf 50 ml aufgefüllt und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt, allerdings ab hier mit RPMI* (RPMI mit 100 µg/µl Penicillin/Streptavidin).

Die Zellen wurden in je 1 ml kaltem RPMI* aufgenommen, die Zellsuspension in 21,5 ml Reaktionsgefäße transferiert und 2 min bei 4°C und 400 g zentrifugiert. Die Sedimente wurden in je 400 µl Monopuffer (PBS + 5 mM EDTA pH 7,4 + 0,5% humanes Serumalbumin) resuspendiert, 100 µl anti-CD14-Antikörper-*Beads* (Fa. Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland) zugegeben, vorsichtig gemischt und 15 min auf Eis inkubiert.

Die in der Zwischenzeit in den Magnetständer eingelegten MiniMacs Säulen wurden mit 500 µl kaltem Monopuffer äquilibriert und ein 50 ml-Röhrchen mit 15-20 ml kaltem RPMI* vorbereitet. Die Zellsuspension wurde nach der Inkubation auf die Säule gegeben, mit 500 µl Monopuffer gewaschen, die isolierten Monozyten anschließend mit 1 ml Monopuffer schnell in das vorbereitete 50 ml-Röhrchen eluiert und 10 min bei 460 x g und 4°C zentrifugiert (s. Abb. 2-2) . Die Pellets wurden in 0,5-2 ml RPMI* (je nach Zelldichte) aufgenommen und in einer Neuenbauer Zählkammer (Fa. Marienfeld, Lauda-Königsfeld, Deutschland) unter dem Mikroskop (Modell IX50; Fa. Olympus Optical GmbH, Hamburg) gezählt. Durch Zugabe von RPMI* wurde eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden die Zellen auf runde (Durchmesser 13mm) *Coverslips* (Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig) mit einer Dichte von 5×10^4 /Coverslip (=100µl) ausgesät; Für eckige *Coverslips* (13,8 x 13,8 mm) wurde die doppelte Menge verwendet. Nach 1 bis 1,5 h wurde 1,5 ml Kulturmedium (RPMI* mit 20% autologem Serum) hinzugefügt und die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

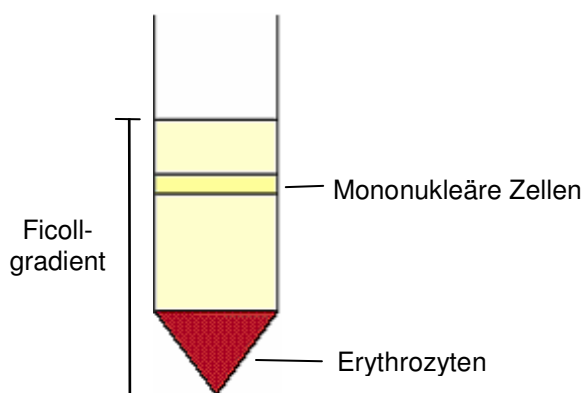
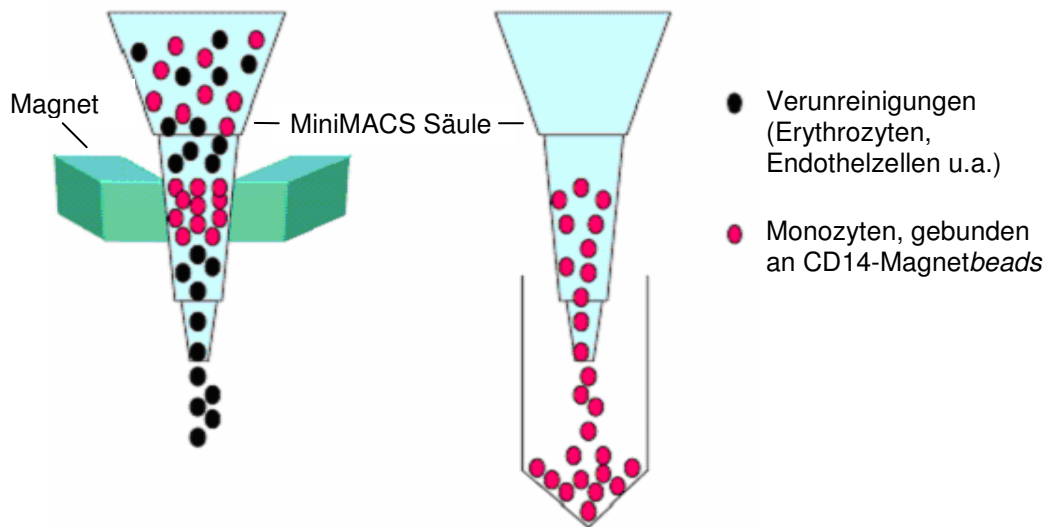


Abb. 2-1:

Auftrennung von primären humanen Makrophagen im Ficollgradient

A) Zellseparation mit Magnet**B) Elution ohne Magnet****Abb. 2-2: Abtrennung der Monozyten durch CD14-Magnetbeads**

- A) Monozyten binden über CD14-Oberflächenmoleküle an die *beads*, während andere Zellen und Verunreinigungen durchfließen
 B) Nach Entfernung des Magneten erfolgt die Elution der an die *beads* gebundenen Monozyten

2.1.3.3 Isolierung menschlicher Endothelzellen aus der Nabelschnur

Humane Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) wurden direkt aus der Nabelschnurvene isoliert (Verfahren nach Jaffe et al., 1973). Die Nabelschnur wurde an jedem Ende um 1 cm gekürzt, in einer sterilen Standapparatur befestigt und desinfiziert. Am oberen Ende der Nabelschnur wurde in die Vene eine Kanüle eingeführt und das gesamte Blut mit 37°C warmem, Gentamycin-haltigem PBS (Fa. PAA Laboratories, Linz, Österreich; 50µg/ml Gentamycin in PBS) ausgewaschen. Danach wurde die Vene mit Chymotrypsin-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 0,1% [w/v] αChymotrypsin in PBS) gespült, um das restliche PBS/Gentamycin zu entfernen. Anschließend wurde das untere Ende der Nabelschnur mit zwei Arterienklemmen abgeschlossen, die Nabelschnur vollständig mit der Chymotrypsin-Lösung gefüllt (leichtes Aufblähen) und anschließend bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die abgelösten Endothelzellen in ein 50 ml-Röhrchen mit FCS eluiert. Das Eluat wurde für 10 min mit 130 x g zentrifugiert (Omnifuge 2.0RS), die Zellen in 24 ml EGM Kulturmedium (Fa. PromoCell, Heidelberg) aufgenommen und in zwei Collagen-beschichtete 75 cm² Kolben ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit. Nach 3 h wurde das Medium erneuert und Blutreste von den adhären Zellen mit PBS gewaschen. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt.

2.1.4 Ablösung adhärenter Zellen

Die Zellen wurden nach Entfernung des Wachstumsmediums einmal mit PBS gewaschen. HUVEC wurden mit 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin aus Schwein und 0,2 g/l EDTA-Na₄ in HBSS, Fa. PAA Laboratories, Linz, Österreich) pro 75 cm²-Kolben abgelöst, für primäre humane Makrophagen wurde Accutase II (Fa. PAA Laboratories, Linz, Österreich) verwendet. Hierzu wurden pro 10 cm²-Wachstumsfläche 500 µl Accutase II eingesetzt und die Zellen für 15-25 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsin-bzw. Accutase II-Aktivität wurde jeweils mit der doppelten Menge an Medium abgestoppt und die Zellen mittels Zentrifugation für 5 min bei 450 x g und 24°C (Zentrifuge Biofuge pico; Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland) sedimentiert und subkultiviert, auf Deckgläschen ausgesät oder für Nukleofektion eingesetzt.

2.1.5 Transfektion von Zellen

Die transiente Transfektion erfolgte mittels Nukleofektion in einem Nukleofektor-Gerät (Modell I, Fa. Amaxa, Köln) nach Herstellerangaben. Für HUVEC wurde das HUVEC-Nukleofektionskit VPB-1002, für Makrophagen die *coded solution* Nr. 6857 (beides Fa. Amaxa, Köln) eingesetzt. Die Nukleofektionslösungen wurden stets in einer Verdünnung 1:2 in PBS verwendet. Für die Transfektion wurden pro Ansatz 1 Mio. 6-8 Tage alte Monozyten verwendet. Es wurden durchschnittlich 1-5 µg DNA eingesetzt, die optimalen DNA-Mengen mussten jedoch für jedes Konstrukt individuell ermittelt werden.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Präparation

2.2.1.1 Plasmide

Expressionsvektor für GFP-Fusionsproteine war pEGFP-N1: (Clontech, vertrieben über BD Biosciences, Palo Alto, USA). Für RNAi-*Knock-down* Versuche wurde das psiSTRIKE U6 hairpin Cloning System (Human)-hMGFP (Fa Promega, Madison, USA) verwendet.

Tabelle 2-1: verwendete Konstrukte von Kooperationspartnern und aus eigener Herstellung

Konstrukt	Beschreibung	Vektor	Herkunft
Cofilin-GFP	Cofilin Wildtyp	eGFP-N1	A. Gringel
S3A-Cofilin-GFP	konstitutiv aktiv	eGFP-N1	
S3D-Cofilin-GFP	keine Aktin-Bindung	eGFP-N1	

PAK4-KM	ohne Kinaseaktivität	pCAN2-myc	A. Minden
PAK4-NE	konstitutiv aktiv	pCAN2-myc	
PAK4- Δ PBD	ohne Regulationsdomäne	HA	
PAK4-RD	ohne Kinasedomäne, nur Regulationsdomäne	HA	
PAK4- Δ PBD Δ KD	keine Kinasedomäne, keine PBD	HA	
sh-PAK4	PAK4 shRNA	psiStrike	A. Gringel
α PIX-wt-D53-GFP	α PIX Wildtyp	pcDNA-DEST	G. Rosenberger
α PIX-wt-D47-GFP	α PIX Wildtyp	pcDNA-DEST	
α PIX-DN	dominant negativ	pMT2SM-HA	
α PIX- Δ SH3	ohne PAK Bindedomäne	pMT2SM-HA	
α PIX- Δ GBD	ohne GIT1 Bindedomäne	pMT2SM-HA	

2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde für analytische und präparative Zwecke durchgeführt. 1 %[w/v] Agarose (SeaKem GTG, Fa. Cambrex, Rockland, USA) wurde in 0,5 x TBE Elektrophoresepuffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA) erhitzt, mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt und in einem Elektrophoresetank (Sub-Cell GT Agarosegelelektrophoresesystem; Fa. Bio-Rad, München) gegeben. Nach Erkalten wurde das Gel mit 0,5 X TBE-Puffer übergossen. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (0,25% [w/v] Bromphenolblau, 0,25% [w/v] Xylencyanol, 30% [v/v] Glycerol, 50 mM EDTA) gemischt und in die Taschen des Gels pipetiert. Als Größenmarker und zur ungefähren Mengenabschätzung dienten 5 μ l Smart-Ladder (Fa. Peqlab Biotechnologies, Erlangen). Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 120 V. Für Dokumentationszwecke wurde das Gel unter UV-Licht (UV Illuminator Model N90M; Fa. UniEquip, Martinsried) mit einer MP-4 Land Camera (Model 44-31; Fa. Polaroid, Offenbach) auf Polapan-Film (Fa. Polaroid, Offenbach) abfotografiert.

2.2.1.3 Plasmidisolierung

Plasmidisolierungen im kleinen Maßstab (Mini-Präp) wurden mit dem „QIA® Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland), Plasmidisolierungen im mittleren Maßstab (Midi-Präp) mit dem „Nucleobond AX100 Midipräp Kit“ der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) jeweils nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Endotoxon-freie DNA-Präparationen wurden für alle zur Transfektion verwendeten Plasmide benutzt. Diese Präparation erfolgte mit dem „Endofree® Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers, um aus der Bakterienmembran stammende Endotoxine zu entfernen.

2.2.1.4 Gelelution

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des „QIAquick™ Gel-Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.2.2 DNA Restriktionsverdau

2.2.2.1 analytisch

Zur Kontrolle von Vektoren oder zur Kontrolle der Klonierung eines DNA-Fragments in einem bestimmten Vektor wurde eine analytische Restriktionshydrolyse mit 0,5-1 U der Typ II Restriktionsendonukleasen angewandt. Die verwendete DNA-Menge betrug ca. 100-200 ng bei einem Gesamtvolumen des Ansatzes von 20 µl. Das notwendige Ionen- und pH-Milieu für das (die) verwendete(n) Enzym(e) wurde (n) durch einen für das (die) Enzym(e) optimierten Restriktionspuffer gewährleistet. Um das Endvolumen von 20 µl zu erreichen, wurde der entsprechende Ansatz mit H₂O_{dd} aufgefüllt.

2.2.2.3 präparativ

Sollte für Klonierungen ein geschnittenes DNA Stück per Gelelution aufgereinigt werden, war es notwendig, größere DNA Mengen (1-10 µg) mit 1-20 U Restriktionsenzym zum Verdau einzusetzen. Dementsprechend erhöhte sich das Gesamtvolumen im Vergleich zum analytischen Verdau auf 40-100 µl.

2.2.3 Ligation

2.2.3.1 Allgemein

Verwendet wurde das Alligator Kit (Fa.Genaxxon, Stafflangen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

Um eine Gensequenz in einen bestimmten Vektor einzuklonieren, musste der Zielvektor und das Fragment zuvor mit Restriktionsenzymen geschnitten werden. Dadurch entstehen jeweils genau zueinander passende Enden (=sticky ends) von Vektor und Gensequenz. Der Vektor enthält hierfür die MCS (*multiple cloning site*), ein kurzes DNA Stück, welches mehrere Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen beinhaltet.

2.2.3.2 Präparation des Zielvektors

Der Zielvektor für die Klonierungen von Cofilin, PAK4 und β PIX war in dieser Arbeit eGFP-N1, der mit den Restriktionsendonukleasen BamH1 und XhoI geschnitten wurde. Für die Klonierung der PAK4 shRNA wurde der Vektor psiStrike verwendet, welcher nach Angaben des Herstellers präpariert wurde (s. 2.2.4)

2.2.3.3 Präparation der DNA Fragmente

Für die Klonierung der PAK4-shRNA wurden synthetische Oligonukleotide eingesetzt, deren Bearbeitung unter Punkt 2.2.3.5 beschrieben wird.

Eines der Ziele der Klonierungsbemühungen war unter anderem die Umklonierung des Cofilins aus dem dsred Vektor in den eGFP-N1 Vektor. Die dazu benötigten größeren Mengen an Cofilin wurden durch PCR gewonnen.

Allgemeiner PCR-Ansatz

Im Allgemeinen benötigt man zur PCR einen DNA-Strang als Matrize, eine DNA Polymerase, Nukleotide und den für die Polymerase optimalen Puffer. Ein Standard-PCR-Lauf erfolgte im Thermocycler Mastercycler gradient (Fa. Eppendorf, Hamburg) je nach Oligonukleotid-Paar und Länge der zu amplifizierenden DNA konnten die *Annealing*-Temperaturen von 50°C bis 65°C und die Extensions-Zeit von 30 sec bis 1,5 min variieren. Die Reaktion wurde mit dem Deep Vent PCR-Kit (Fa. New England Biolabs, Beverly, USA) durchgeführt.

Allgemeiner PCR Ansatz	
5 μ l	10x Puffer
1 μ l	Nukleotidmix
0,5 μ l	<i>Forward</i> -Primer
0,5 μ l	<i>Reverser</i> -Primer
100ng	DNA
1 μ l	<i>Taq</i> -Polymerase
ad 50 μ l	H ₂ O _{dd}

Tabelle 2-2: Zur Sequenzierung und für PCR verwendete Oligonukleotide

Name	Accession Nr.	Sequenz (5'→3')
Cof rev neu	NM005507	TTAATTAATTGGATCCCGCAAAGGCTTGCCCT
Cof forw neu	NM005507	TTAATTAATTCTCGAGGCCACCATGGCCTCCGGTGT
Cof forw S3D neu	NM005507	TTAATTAATTCTCGAGGCCACCATGGCCGACGGTGT
eGFP-N1-f		GCAGAGCTGGTTTAGTGAACGG
eGFP-N1-r		CGTCGCCCGCGTCCAGCTCGACCAG

Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem „QIAquick™ PCR-Purification Kit“ oder per Gelelution mit dem „QIAquick™ Gel-Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

2.2.3.4 Klonierung mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide

Für Klonierungen der PAK4-shRNA wurden von der Firma MWG synthetisierte Oligonukleotide eingesetzt, die zunächst als Einzelstränge vorlagen.

Tabelle 2-3: Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Accession Nr.	Sequenz
PAK4si-1 (shin)	NM005884	GATCCCCGAATGTGGTGGAGATGTACTTCAAG AGAGTACATCTCCACCACATTCTTTTT
PAK4si-2 (shin)	NM005884	GGGCTTACACCACCTCTACATGAAGTTCTCTCA TGTAGAGGTGGTGTAAAGAAAATCGA

a) Annealing-Reaktion

Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden mit H₂O_{dd} auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Anschließend erfolgte die Hybridisierung zu einem Doppelstrang. Dazu wurden je 500 pmol jedes Einzelstrang- Nukleotids (*forward* und *revers*) in 50 μl Endvolumen bei 95°C für 5 min inkubiert, danach sofort in ein 60°C warmes Wasserbad gegeben und langsam auf 30°C abgekühlt.

Die Reaktion ergab 10 pmol/μl hybridisiertes, doppelsträngiges Produkt. Davon wurden 10 μl in die Phosphorylierungsreaktion (2.2.3.4) eingesetzt.

b) Phosphorylierung der Oligonukleotide

Die T4-DNA-Ligase benötigt zur Ligation DNA-Stränge, die am 5'-Ende eine Phosphatgruppe tragen. Da diese bei synthetischen Oligonukleotiden nicht vorhanden ist,

muß der Ligation eine Phosphorylierungsreaktion vorgeschaltet werden. Dazu wurde T4-Polynukleotidkinase (PNK) verwendet.

Reaktionsansatz Phosphorylierung	
23,5µl	H ₂ O _{dd}
4µl	10x Kinase-Puffer
10µl	<i>Annealing</i> Produkt
0,5µl	ATP, neutralisiert (100mM Stock)
2µl	PNK (10U/µl)
40µl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und die DNA im Anschluß daran durch Fällung aufgereinigt. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit H₂O_{dd} auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und 10 µl 5 M NaCl und 250 µl abs. EtOH zugegeben. Die Mischung wurde für 10 min bei -80 °C inkubiert, danach mit 13000 rpm (Biofuge *fresco*) bei 4 °C für 20 min abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach kurzer Trocknungszeit wurde das Pellet in 50 µl H₂O_{dd} aufgenommen und für die Ligation eingesetzt.

2.2.3.5 Ligation

Für einen Ligationsansatz wurden 50 ng geschnittener Vektor und 50 bzw. 500 ng des präparierten DNA-Fragments eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 16 °C über Nacht im Wasserbad inkubiert.

a) Reaktionsansatz

Reaktionsansatz Ligation	
50ng	Vektor
50 (500) ng	<i>Insert</i>
2µl	5x Ligasepuffer
1µl	T4-Ligase
ad 20µl	H ₂ O _{dd}

b) Reinigung des Ligationsansatzes

Um die ligierten Plasmide für die Transformation in elektrokompente Bakterien verwenden zu können, wurde die Ionenstärke des Ansatzes durch Umfällen (oder besser Umpuffern) reduziert. Dazu wurde der unter Punkt 2.2.3.4 aufgeführte Reaktionsansatz mit H₂O_{dd} auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, 1/10 Vol. 5 M NaCl und 2,5 Vol. abs. EtOH gegeben und wie unter Punkt 2.2.3.4 beschrieben zentrifugiert.

2.2.3.5 Transformation in Zellen

2-5 µl der aufgereinigten Ligation wurden in elektrokompetente *E.coli* transformiert, auf selektive LB-Agarplatten ausgestrichen und positive Klone mittels Bakterien-PCR identifiziert.

2.2.3.6 Bakterien-PCR (Kolonie-PCR)

Diese Methode erlaubt es, positive Klone direkt mittels PCR zu identifizieren, ohne die Plasmid-DNA isolieren zu müssen.

Dazu wurden pro Platte von ca. 10 Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in 15 µl H₂O_{dd} resuspendiert. 5 µl dieser Suspension wurden in 5 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum bei 37°C schüttelnd inkubiert, der Rest zum Aufschluß der Bakterien für 5 min bei 95°C gekocht. Dadurch wurde die Plasmid-DNA freigesetzt und konnte direkt für die PCR eingesetzt werden.

Allgemeiner Ansatz für die Bakterien-PCR	
5µl	10x Puffer
1µl	Nukleotidmix
0,5µl	<i>Forward-Primer</i>
0,5µl	<i>Reverser-Primer</i>
5µl	DNA
0,5µl	<i>Taq-Polymerase</i>
ad 50µl	H ₂ O _{dd}

Die für die Bakterien-PCR eingesetzten Oligonukleotide mussten je nach Konstrukt individuell gewählt werden. Dabei unterschieden sich die *Annealing*-Temperaturen je nach *Primer*-Paar von 55°C bis 63°C. Die Bakterien-PCR wurde mit dem *Taq* PCR Core Kit (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Plasmide positiver Klone wurden mit der unter 2.2.1.3 beschriebenen Methode aus *E.coli* isoliert und zur Sequenzierung gegeben (Fa. Agowa, Berlin, Deutschland).

2.2.4 RNA-Interferenz (RNAi)

Die Klonierung Vektor-kodierter shRNA wurde mit Hilfe des psiSTRIKE U6 hairpin Cloning System (Human-)hMGFP (Fa. Promega, Madison, USA) durchgeführt. Dazu wurden nach Angaben des Herstellers geeignete Oligonukleotide entworfen und in den psi-STRIKE-Vektor eingefügt, welcher zugleich für hMGFP kodiert, wodurch die Identifikation

transfizierter Zellen ermöglicht wird (s. Abb. 2-3). 0,5-2 µg des Vektors wurden mit Hilfe des Nukleofectors in primäre humane Makrophagen transient transfiziert.

Tabelle 2-4: Oligonukleotide für shRNA Klonierung

Name	Targetsequenz	Accession Nr.	Sequenz (5'→3')
A siPAK4	1173-1191	NM 005884	ACCGGACAACCTTCATC AAGATTCTTCCTGTCA AATCTTGATGAAGTTG TCCTTTTTC
B siPAK4		NM 005884	TGCAGAAAAAGGACAA CTTCATCAAGATTTGA CAGGAAGAATCTTGAT GAAGTTGTC
st32scr_f			ACCGTATCAGACTGTG TGAGATTTCAAGAGAA TCTCACACAGTCTGAT ACTTTTTC
st32scr_r			TGCAGAAAAAGTATCA GACTGTGTGAGATTCT CTTGAAATCTCACACA GTCTGATA

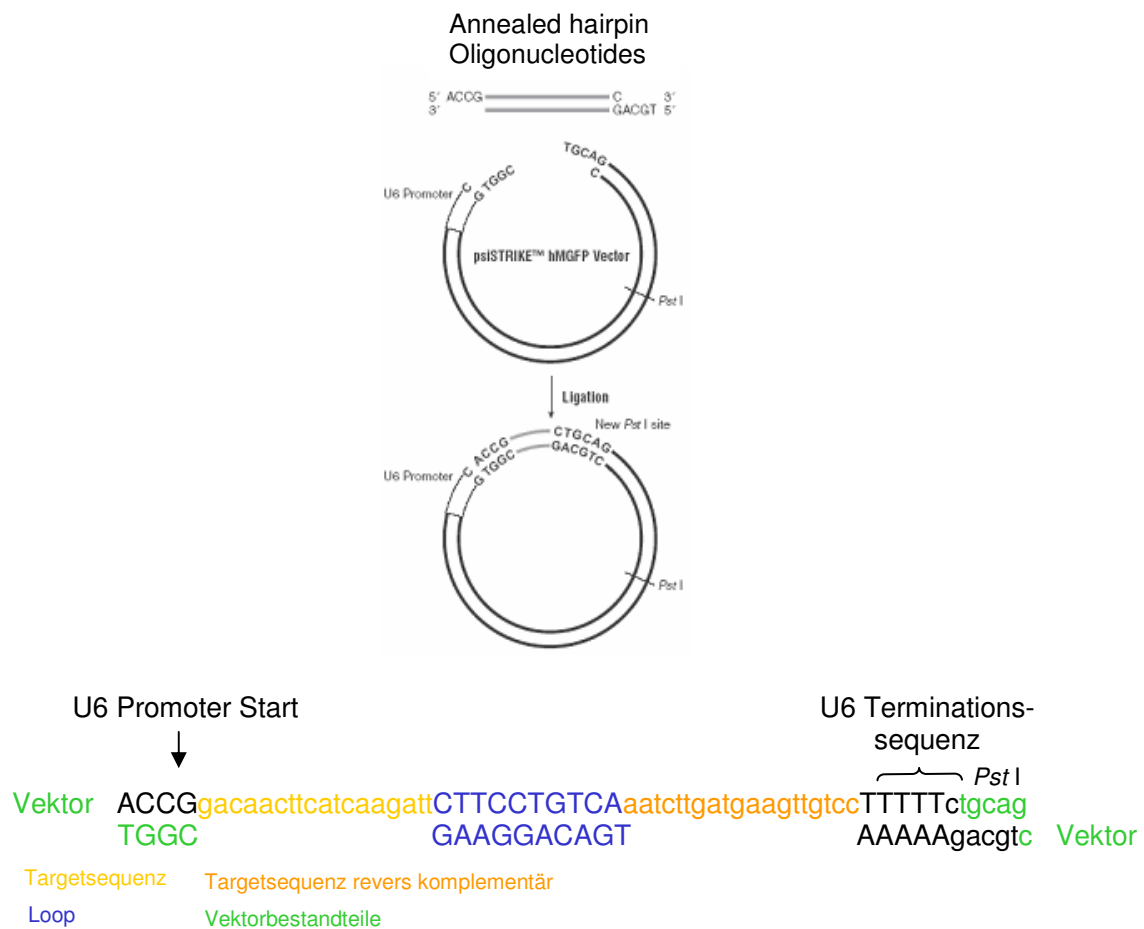


Abb. 2-3: Prinzip des psiSTRIKE U6 hairpin Cloning System

2.2.5 DNA *micro array*

Die DNA-Arrays wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Reinhard Hoffmann (Pettenkofer-Institut, München) und Dr. Petra Kopp aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Die gesamte zelluläre RNA von frisch isolierten Monozyten und von sechs Tage alten Makrophagen wurde jeweils mit TRIzol nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA-Konzentration wurde durch Spektrophotometrie und Gel-Elektrophorese bestimmt. Anschließend wurde die RNA nach Herstellerangaben fluoreszenzmarkiert und hybridisiert mit den *Affymetrix HumanGenome HG U133Plus Arrays*, welche 47000 Transkripte enthalten. Die Fluoreszenzintensität wurde ausgelesen und mit der Software *Affymetrix MICROARRAYSUITE version 5* gemessen. Alle Messungen wurden zweimal durchgeführt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinbestimmung wurde mit BIO-RAD Protein Assay, das auf der Bradford-Methode beruht, durchgeführt (Bradford, 1976). Als Proteinstandard für den Protein-Microassay (1-20 µg Protein; 25 µg/ml) wurde BSA in den Konzentrationen 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml verwendet. Die Bestimmung der Proteinmenge wurde für alle Proben wie folgt durchgeführt: Zu 800 µl Probe (Proteinstandard in der oben angegebenen Konzentration bzw. verdünnte Proteinlösung) wurden 200 µl *Dye Reagent Concentrate* gegeben. Als „Nullwert“ wurde 800 µl Puffer als Probe eingesetzt. Die so entstandenen Lösungen wurden durch kurzes Vortexen gemischt. Nach 5 min bis 1 h Inkubationszeit wurde für alle Proben die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Standardwerte der BSA-Proben wurden gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen und dienten als Eichkurve. Aus der Eichkurve wurden dann die Proteinkonzentrationen der Proben abgelesen.

2.3.2 Western Blot

2.3.2.1 Puffer und Lösungen

5x SDS Probenpuffer nach Lämmli	
5 ml	0,5M TRIS/HCl pH 6,8
2 ml	Glycerol
0,8 g	SDS
1 ml	0,5% Bromphenolblau
2 ml	H ₂ O _{dd}

Die gelösten Bestandteile wurden steril filtriert und 1:5 auf das gewünschte Endvolumen, zusammen mit 5 % β -Mercaptoethanol (Endkonzentration) verdünnt.

Puffer	Substanz
Trenngelpuffer	1,5 M Tris 1g SDS ad 250 ml H ₂ O _{dd} , pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 1g SDS ad 250 ml H ₂ O _{dd} , pH 6,8
Running-Puffer	25 mM Tris 0,1% SDS 192 mM Glycin
Blotting-Puffer	25 mM Tris 96 mM Glycin
TBS	20 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl
TBST	TBS mit 0,3% Tween
Blocking Puffer	TBST 5% Magermilchpulver 2% BSA

	Trenngel		
		10%	12,5%
Minigel	H ₂ O _{dd}	2,09 ml	1,60 ml
	Trenngelpuffer	1,25 ml	1,25 ml
	Acrylamid	1,67 ml	2,08 ml
	APS (100 ng/ml)	25 μ l	25 μ l
	TEMED	2,5 μ l	2,5 μ l
	Sammelgel		
	H ₂ O _{dd}	1,55 ml	
	Sammelgelpuffer	625 μ l	
	Acrylamid	325 μ l	
	APS (100 ng/ml)	12,5 μ l	
	TEMED	2,5 μ l	
	Trenngel		
		10%	12,5%
Maxigel	H ₂ O _{dd}	20,25 ml	13,45 ml
	Trenngelpuffer	12,5 ml	10 ml
	Acrylamid	16,5 ml	16 ml
	APS (100 ng/ml)	250 μ l	200 μ l
	TEMED	25 μ l	20 μ l
	Sammelgel		
	H ₂ O _{dd}	9,40 ml	
	Sammelgelpuffer	3,75 μ l	
	Acrylamid	1,95 μ l	
	APS (100 ng/ml)	75 μ l	
	TEMED	15 μ l	

2.3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit der SDS Page Gelelektrophorese. Ähnlich der DNA Gelelektrophorese geschieht dies aufgrund des Reibungskoeffizienten der Proteine und damit über ihre Größe. Die folgenden Angaben beziehen sich auf ein Minigel, die Werte für ein Maxigel stehen jeweils dahinter in Klammern.

Die bereits in SDS Probenpuffer vorliegenden Zelllysate wurden 5 min bei 95°C schüttelnd inkubiert. Danach wurden 30 µl (60µl) pro Spur auf das Gel geladen. Zur Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine wurde auf jedes Gel zusätzlich eine Spur mit 5 µl (15µl) Proteinmarker (*low range prestained* Proteinmarker, Fa. Biorad) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 150 V (300V). Anschließend wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel zum *Blotten* in *Blotting*-Puffer äquilibriert.

2.3.2.3 Blotting

Während der Gelelektrophorese wurden die PVDF-Membran und das Whatman-Papier auf Gelgröße passend zurechtgeschnitten. Zum Äquilibrieren wurde die Membran kurz in 100 % Methanol gelegt, anschließend für 10 min bei RT in *Blotting*-Puffer mit 20 % Methanol inkubiert und bis zum Gebrauch in *Blotting*-Puffer feucht gehalten. Der Proteintransfer erfolgte für 1 h bei 4°C mit konstant 80 V für ein Minigel und für 3 h unter Kühlung mit konstant 100 V für ein Maxigel.

2.3.2.4 Detektion

Nach Beendigung des Proteintransfers auf die PVDF-Membran wurde diese für 1 h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) in Blocking Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Membran dreimal je 5 min in TBST gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper, verdünnt 1:2000, für 1 h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimal fünfminütiges Waschen in TBST entfernt. Zur Detektion des primären Antikörpers wurde die Membran anschließend für 45 min mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären HRP-gekoppelten Antikörper (Fa. Amersham Biosciences, Little Chalfont, Großbritannien) inkubiert.

Tabelle 2-5: sekundäre Antikörper für Western Blot

gekoppeltes Enzym	Isotyp, Spezies
Meerrettich Peroxidase-gebundener gesamter Antikörper (IgG)	Anti-mouse IgG, (Schaf)
Meerrettich Peroxidase-gebundenes IgG F(ab) ₂ Fragment	Anti-rabbit IgG, (Esel)
Meerrettich Peroxidase-gebundener gesamter Antikörper (IgG)	Anti-rabbit IgG, (Schaf)

Nach erneutem Waschen, wurde die Membran mit *Super Signal® West Pico Luminol Enhancer* und *Super Signal® Stable Peroxide Solution* Detektionslösung (Fa. Pierce,

Rockford, IL, USA) - gemischt im Verhältnis 1:1 - für 15 min bei RT versetzt, anschließend in Folie eingewickelt, zur Markierung mit Streifen von *GLOCOM II Autorad Markers* versehen, ein Kodak-Film für unterschiedliche Zeiten (je nach Stärke des Signals) aufgelegt, entwickelt und fixiert.

2.3.2.5 Molekulargewichtsbestimmung

Als Marker für die Größenbestimmung von Proteinen wurde der *prestained high range* Proteinmarker (Fa. peqlab, Erlangen) verwendet. Zur Abschätzung der molekularen Masse wurden die Laufstrecken der Markerproteine vom oberen Trenngelrand aus gemessen und gegen den Logarithmus der molekularen Massen aufgetragen. Die apparenten molekularen Massen der zu bestimmenden Proben wurden aus dieser Eichgeraden abgelesen.

2.3.3 Interaktionsstudien

2.3.3.1 Vorbemerkung

Für alle Immunpräzipitationsversuche ist es von enormer Wichtigkeit, dass sie möglichst bei 4°C von statten gehen, da sonst die zelleigenen Proteinasen die Proteine abbauen würden. Deshalb wurden die Versuche nach Möglichkeit in der Kühlkammer und mit gekühlten Puffern und Reaktionsgefäßen durchgeführt.

2.3.3.2 Herstellung von Zelllysaten aus humanen Zellen

Die Zellen wurden mit PBS (Dulbecco's PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , Fa. PAA, Linz, Österreich) gewaschen und nach Zugabe von 200 µl des entsprechenden Lysepuffers (s. 2.3.3.4) mit Hilfe eines *Zellscrapers* (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) vom Kulturgefäß entfernt. Die Zusammensetzung des Lysepuffers variierte je nach dem zu präzipitierenden Protein. Der Zellaufschluß erfolgte durch 30-minütige Inkubation in Detergens-haltigen Lysepuffern bei 4°C. Bei der anschließenden 10-minütigen Zentrifugation (3500 xg, 4°C) wurden Zelltrümmer entfernt und der Überstand in Immun-Präzipitationsversuchen eingesetzt. Eingesetzte Zellmengen: Monozyten 6-9 Mio.; HUVEC 8-10 Mio.

2.3.3.3 Differentielle Lyse

Für differentielle Lyse Experimente wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 200 µl eines speziellen Lysepuffers (Lysepuffer I) für 10 Minuten schüttelnd inkubiert. Zellkörper und Zytoplasma wurden abgenommen (zytosolische Fraktion). Die verbliebenen noch haftenden Zellbestandteile wurden dreimal mit je 100 µl Lysepuffer II gewaschen und mit Hilfe des *Zellscrapers* vom Kulturgefäß entfernt. Mikroskopische Kontrollen nach dem ersten Lyseprozess sollten sicherstellen, dass die

Adhäsions-vermittelnden Zellbestandteile (inclusive Podosomen) noch am Substrat hafteten, während die Zellkörper und das Zytoplasma schon entfernt waren. Die gewonnenen Zytoplasma-reichen bzw. Podosomen-reichen Zellfraktionen wurden anschließend mit Western Blot oder unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop analysiert.

Differentielle Lyse Puffer	
Lysepuffer I	20 mM Tris-HCl pH 7,4
	5 mM EDTA
	1mM Vanadat
	1% Triton
	1 Tbl. PI mini
Lysepuffer II	20 mM Tris-HCl pH 7,4
	5 mM EDTA
	0,1 % SDS
	1 % Na-Deoxycholat
	1 Tbl. PI mini

2.3.3.4 Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation wurde das μ MACS-Kit (Fa. Miltenyi, Bergisch-Gladbach) verwendet. 4 μ g des jeweiligen Antikörpers wurden mit 50 μ l Protein A oder Protein G-gekoppelten Magnetkugeln zum Zelllysate gegeben und für 1,5 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Als Kontrolle diente jeweils unspezifisches IgG der jeweiligen Spezies. μ MACS-Säulen wurden im μ MACS-Multi-Ständer mit 200 μ l Lysepuffer äquilibriert und das Zelllysate-Antikörper-Protein A/G-Kugel-Gemisch darauf gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen, die Säulen wurden 4-mal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 μ l 95°C heißen SDS-Puffer nach Lämmli.

Die Analyse der IP erfolgte mit dem Western Blot.

PAK4 IP Puffer	
Lysepuffer	50 mM MOPS
	150 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	1% Triton
	1 Tbl. PI mini
Waschpuffer	wie Lysepuffer nur 0,1% Triton und 10% Glycerin

β–PIX IP Puffer	
Lysepuffer	50 mM MOPS
	50 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	1% Triton
	1 Tbl. PI mini
Waschpuffer	wie Lysepuffer nur 0,1% Triton und 10% Glycerin

GIT1 IP Puffer	
Lysepuffer	50 mM MOPS
	120 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	1% Triton
	1 Tbl. PI midi
Waschpuffer	wie Lysepuffer

Co-IP Puffer (PAK4-β–PIX)	
Lysepuffer	50 mM MOPS
	100 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	1% Triton
	1 Tbl. PI midi
Waschpuffer	wie Lysepuffer

2.4 Immunfluoreszenz und Mikroskopie

2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Fluoreszenzfärbungen wurden zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Proteinen verwendet. Außerdem ließen sich Co-Lokalisationen verschiedener Proteine mittels Co-Färbungen und konfokaler Mikroskopie nachweisen.

2.4.1.1 Fixierung und Lyse von Zellen

Formaldehyd/Aceton (FA/Ac):

Die auf Coverslips ausgesäten Zellen wurden in 3,7 % [v/v] Formaldehyd in PBS für 10 min bei RT fixiert. Die Permeabilisierung erfolgte anschließend in eiskaltem Aceton bei -20 °C für 3-5 min. Zur Entfernung des restlichen Acetons wurden die Deckgläschen in PBS mit 1 % [w/v] BSA gewaschen.

Methanol (M):

Durch die Behandlung in -20°C bzw. -80°C kaltem Methanol für 10-60 sec wurden die Zellen sowohl fixiert als auch permeabilisiert. Anschließend wurden die Deckgläschen sofort in PBS mit 1 % BSA gewaschen, um das restliche Methanol zu entfernen.

2.4.1.2 Färbung mit spezifischen Antikörpern

Alle folgenden Inkubationen erfolgten bei RT in einer feuchten Kammer, wobei die Coverslips mit der Zellseite nach unten auf die auf den Parafilm (Fa. American National Can, Menasha, USA) vorpipettierte Lösung (33 µl) gelegt wurden.

Die Färbung *per se* erfolgte in drei durch Waschschriffe voneinander getrennten Stufen. Zunächst wurden unspezifische Bindungen mittels PBS mit 1% [w/v] BSA, 5% [w/v] NGS und 5% [v/v] Humanserum abgesättigt. Nach einem Waschschriff in PBS mit 1% BSA wurden die Zellen mit dem primären Antikörper für 45 min bei RT inkubiert. Wurden mehrere Zielproteine durch Färbung detektiert, mußten die primären Antikörper sukzessive und durch Waschschriffe voneinander getrennt auf die Zellen gegeben werden. Zur Entfernung der nichtgebundenen primären Antikörpermoleküle wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS mit 1% BSA gewaschen und anschließend für 30 min mit dem (den) gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper(n) (1:100) bei RT gefärbt. Filamentöses Aktin wurde meist mit Alexa 568 gekoppeltem Phalloidin (1:200) gefärbt, welches zusammen mit den sekundären Antikörpern auf die Zellen gegeben wurde. Darauf folgten drei Waschschriffe in PBS, bevor die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf einem Objektträger mit 4 µl vorpipetiertem 37°C warmem Mowiol (enthält *p*-Phenylendiamin als Antibleichmittel) eingebettet und mit Nagellack versiegelt wurden.

Tabelle 2-6: primäre Antikörper

Antikörper	Art, Spezies	Hersteller/Kooperationspartner	Verdün-nung	Fixierung
Aktin	Monoclonal, mouse; MAB 1501	Chemicon, Temencula, USA	1:200	M
GFP	polyclonal, rabbit	von H. Faix, Adolf- Butenandt-Institut, Zellbiologie, LMU	1:300	FA/Ac
HA	monoclonal, rat; clone 3F10	Roche, Penzberg, Deutschland	1:500	FA/Ac
HA	monoclonal, mouse; HA.11	Eurogentec, Seraning, Belgien	1:1000	FA/Ac
myc	monoclonal, mouse	von R. Gräf, Adolf- Butenandt-Institut, Zellbiologie, LMU	unver- dünnt	FA/Ac
PAK1	polyclonal, rabbit	Cell signaling,	1:10	M
PAK4	polyclonal, rabbit	Cell signaling,	1:10	M

Paxillin	monoclonal, mouse; P13520, clone 349	BD Transduction	1:200	FA/Ac
β -PIX	polyclonal, rabbit	Chemicon, Temecula, USA	1:100	FA/Ac
GIT1	polyclonal, goat	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1:10	FA/Ac

Antikörper	gekoppelter Farbstoff	Hersteller	Verdünnung
Rhodamin-Phalloidin	Alexa-568 markiertes Phalloidin;	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	1:200
Phalloidin	Cy-5 markiertes Phalloidin	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	1:50

Tabelle 2-7: sekundäre Antikörper

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller
Anti-mouse	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG (H+L)	Molecular Probes
Anti-rabbit	Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Molecular Probes
Anti-rat	Alexa Fluor® 488 goat anti-rat IgG (H+L) Alexa Fluor® 568 goat anti-rat IgG (H+L)	Molecular Probes

Alle sekundären Antikörper wurden in der Verdünnung 1:100 eingesetzt.

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie und Bildverarbeitung

Die Analyse fluoreszenzmarkierter Präparate erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Fa. Leica, Wetzlar), welches mit einer digitalen „Spot“-Kamera (Fa. Leica) verbunden war, oder mittels eines konfokalen *laser scanning* Mikroskops (DM IRB Fa. Leica, Wetzlar).

Die Bildverarbeitung erfolgte mit den Programmen „Imaging“ (Fa. Microsoft, Seattle, USA) „imageJ“ (National Institutes of Health, Washington, USA) „Photoshop“ (Fa. Adobe, San Jose, USA) und „Corel Draw“ (Fa. Corel, Ottawa, Kanada).

3 Ergebnisse

3.1 Zielsetzung der Arbeit

Podosomen sind hochdynamische Adhäsionsstrukturen, die aus einem F-Aktin-reichen Kern und einer Ringstruktur aus Plaqueproteinen wie Paxillin und Vinkulin bestehen. Um die hohe Dynamik aufrecht zu erhalten, sind rasche und genau regulierte Aktin-Polymerisierungs- und -Depolymerisierungsprozesse eine unabdingbare Voraussetzung. Die Regulation dieses Aktinumsatzes wird im Wesentlichen durch Rho-GTPase-Signalwege und Aktin-regulatorische Kaskaden bewerkstelligt. Wie diese Signale genaue Änderungen der Podosomenformation und der Dynamik herbeiführen ist derzeit noch unklar. Ziel dieser Arbeit war es, die spezifischen Auswirkungen verschiedener RhoGTPase-Effektoren auf die Podosomenbildung und -dynamik zu erforschen.

3.2 Bedeutung von Cofilin für die Podosomen-Regulation

Ein wichtiges Bindeglied zwischen RhoGTPase initiiertter Aktinreorganisation und dem Aktinfilament stellt Cofilin dar. Es beeinflusst als Aktin-bindendes Protein den *Turnover* des Zytoskeletts direkt am Aktin-Filament und steht somit am Ende der Signalkaskade. Cofilin selbst kann durch verschiedene Wege reguliert werden. Der für diese Arbeit bedeutendste ist die über *p21-activated kinases* (PAK) und LIM-Kinasen vermittelte Cofilin-Inaktivierung.

Cofilin beeinflusst den Aktin-Filament-*turnover* über zwei Mechanismen: Einerseits erhöht Cofilin die Aktin-Depolymerisationsrate am *pointed end* und sorgt damit für den erforderlichen Aktinmonomer-Nachschub für das Wachstum am *leading edge*. Andererseits werden durch die *severing*-Funktion neue *barbed ends* geschaffen, die verlängert werden können (Maciver et al., 1998).

In den meisten Zellen zeigt Cofilin eine diffuse Verteilung, jedoch lokalisiert es in stimulierten Zellen v.a. an Orten mit hoher Aktin-Dynamik, wie z.B. Lamellipodien, *ruffles* und am *leading edge* polarisierter Zellen (Yonezawa et al., 1987; Dawe et al., 2003; Arai et al., 2003; Bailly et al., 2003). Dr. Daniel Walz, ein Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, untersuchte bereits die Verteilung von Cofilin in primären humanen Makrophagen mittels Antikörper-Färbung (Dissertation Dr. Daniel Walz, Regulation podosomaler Adhäsionen in Makrophagen durch Cofilin-regulatorische Signalwege, 2005). Er stellte fest, dass nahezu der gesamte Cofilin-*pool* in den Podosomen zu finden ist und dass die Anzahl der Podosomen eng mit dem Vorhandensein von phosphoryliertem und damit inaktiviertem Cofilin korrelierte, welches den Aktin*turnover* zu Gunsten des Aktinaufbaus verschiebt. Er

schloss daher auf die Beteiligung von Cofilin an der Regulation der Podosomen-Dynamik in humanen Makrophagen.

3.2.1 Auswirkungen der Cofilin-Überexpression auf primäre humane Makrophagen

Die Transfektion mit GFP-Cofilin-Fusionskonstrukten und die damit verbundene Cofilin-Überexpression sollte zunächst Aufschluss über die Verteilung des Proteins in humanen Makrophagen geben und weiter die Auswirkungen auf die Podosomen im zeitlichen Verlauf aufzeigen. Hierzu wurde die humane Cofilin cDNS Sequenz aus einem bereits vorhandenen Cofilin-dsRedII-Konstrukt in einen GFP-Vektor umkloniert. Anschließend wurde das Fusionsprotein mittels Nukleofektion (s. 2.1.5) in die Zellen eingebracht. Nach einer Expressionszeit von 4h, 8h bzw. 24h wurden die Zellen fixiert und F-Aktin mit Alexa-568 markiertem Phalloidin gefärbt.

Als Kontrolle für alle Cofilin Überexpressionsversuche diente das GFP-Protein, das unter gleichen Bedingungen exprimiert wurde. 95% der transfizierten Kontrollzellen zeigten bei normaler Zellgestalt eine zytosolische Verteilung des GFP-Proteins. Alle eventuellen phänotypischen Veränderungen in Cofilin-transfizierten Zellen sind demnach auf den Cofilin-Fusionsanteil des Transfektionskonstrukts zurückzuführen.

Die mit Cofilin-GFP transfizierten Zellen wurden bezüglich des Vorhandenseins von Podosomen, der Cofilin-Lokalisation und der Zellform mit einem konfokalen Laser-scanning-Mikroskop analysiert. Es zeigte sich, dass nahezu alle regulär gestaltigen Zellen Podosomen ausbildeten und in über 2/3 der Fälle Cofilin auch direkt in Podosomen lokalisierte. Zusätzlich konnte eine diffuse Cofilinanreicherung im direkten Podosomenumfeld beobachtet werden (s. Abb.3-1 A und Abb. 3-2 A).

3.2.2 Überexpression von Cofilin-Mutanten und deren Auswirkungen auf primäre humane Makrophagen

Zusätzlich wurden zwei Cofilin-Konstrukte nach o.g. Kriterien transfiziert, exprimiert und analysiert: S3A-Cofilin, das konstitutiv aktiv ist und S3D-Cofilin, welches nicht mehr an das Aktin-Filament binden kann.

Die Herstellung der S3D-Cofilin-GFP Mutante erfolgte durch PCR-Mutagenese. Die hierzu verwendeten *primer* wurden uns von unserem Kooperationspartner Pankaj Goyal (Institut für Kreislauferkrankheiten, LMU, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Im S3D-Cofilin Konstrukt ist die dritte Aminosäure, Ser-3, gegen Asparaginsäure ausgetauscht, wodurch es nicht mehr an Aktin binden kann (Moriyama et al., 1996; Bamberg et al., 1999).

80% der transfizierten Zellen zeigten nach 4h Expression Podosomen und eine diffuse zytosolische Verteilung von S3D-Cofilin-GFP ohne direkte Co-Lokalisation des Fusionskonstrukts mit Podosomen. Nach 8h und 24h zeigten die transfizierten Makrophagen im Vergleich zur Kontrolle jedoch nur noch in 20% der Fälle Podosomen. Hingegen zeigten sie hinsichtlich der S3D-Cofilin Lokalisation und Zellgestalt keinerlei Abweichungen im Vergleich zur Zellgruppe, die das mutierte Protein nur 4h exprimierten (s. Abb. 3-1 B und Abb. 3-2 B).

Auch ein weiterer *primer* für ein S3A-Cofilin-myc Konstrukt wurde von unserem Kooperationspartner Pankaj Goyal (Institut für Kreislaufkrankheiten, LMU, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Durch einen Aminosäureaustausch (Serin-3 gegen Alanin) ist S3A-Cofilin, im Gegensatz zum Cofilin-Wildtyp, konstitutiv aktiv. Die transfizierten Zellen wurden nach 4h und 8h analysiert. Bei weitestgehend unverändert normaler Zellform, zeigten 2/3 der transfizierten Zellen keine Podosomen mehr, die Podosomen der restlichen Zellen enthielten deutlich weniger *myc-tag* bzw. inkorporierten weniger S3A-Cofilin. Leider war die Zellanalyse nach 24h nicht mehr möglich, da die transfizierten Zellen sich zu diesem Zeitpunkt in allen Versuchen von der Unterlage abgelöst hatten (s. Abb. 3-1 C; s. Abb. 3-2 C).

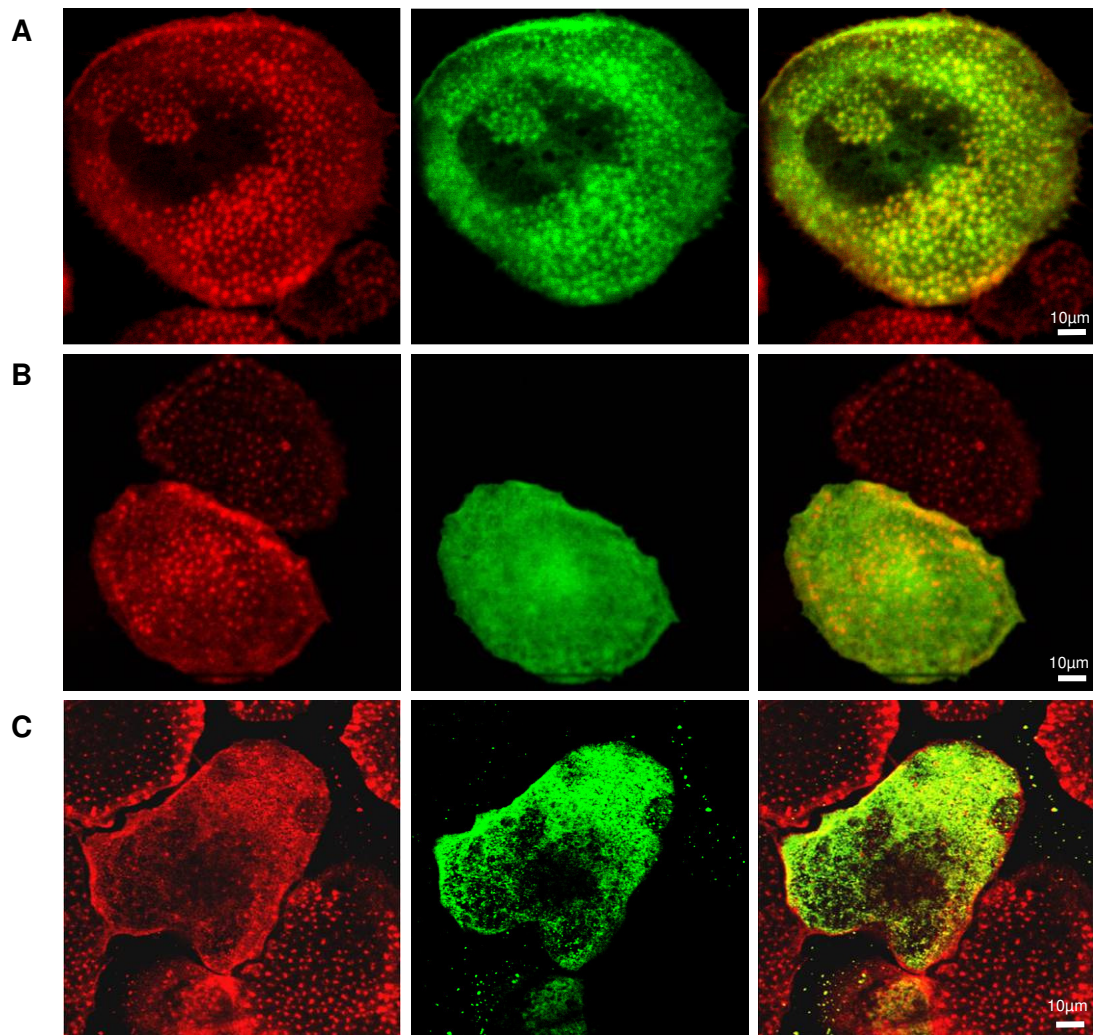
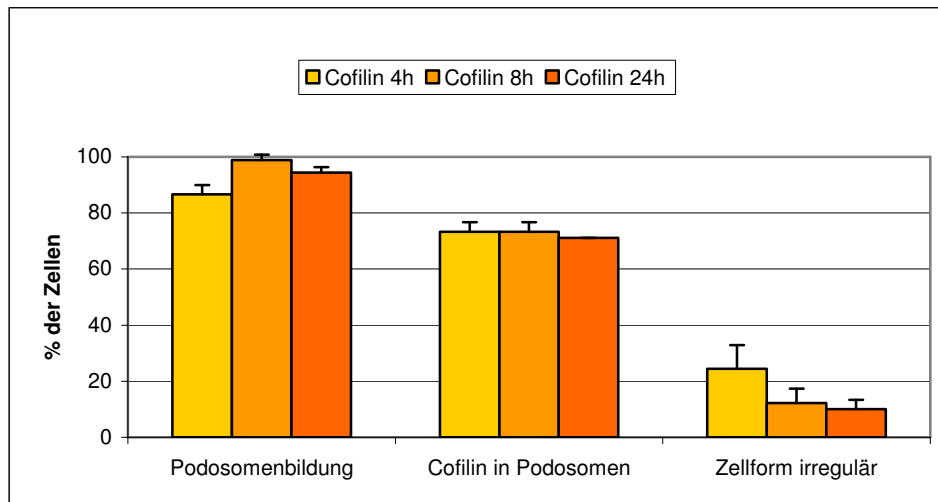


Abb. 3-1: Lokalisation von GFP-markierten Cofilinkonstrukten in primären humanen Makrophagen.

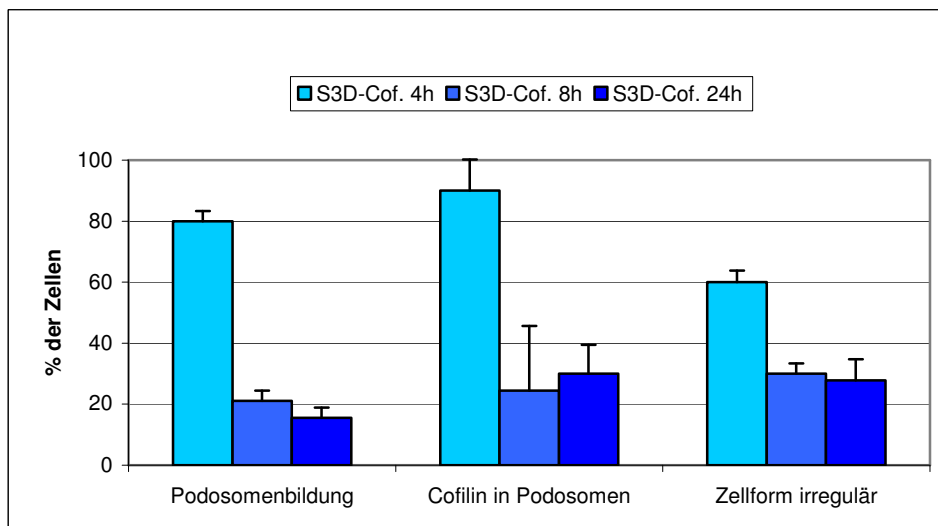
Konfokalmikroskopische Aufnahme 7 Tage kultivierter Makrophagen. Fixierung nach 8h; F-Aktinfärbung mit Alexa-568-markiertem Phalloidin (rot), GFP-Cofilin und GFP-S3D-Cofilin (grün), S3A-Cofilin mit anti-myc Antikörper gefärbt (grün).

- (A) GFP-Cofilin: Cofilin-Lokalisation in und um Podosomen.
- (B) S3D-Cofilin: keine Co-Lokalisation mit Podosomen, diffuse Verteilung im Zytoplasma.
- (C) S3A-Cofilin: deutlich verminderte Podosomenanzahl; keine Co-Lokalisation mit Podosomen.

A



B



C

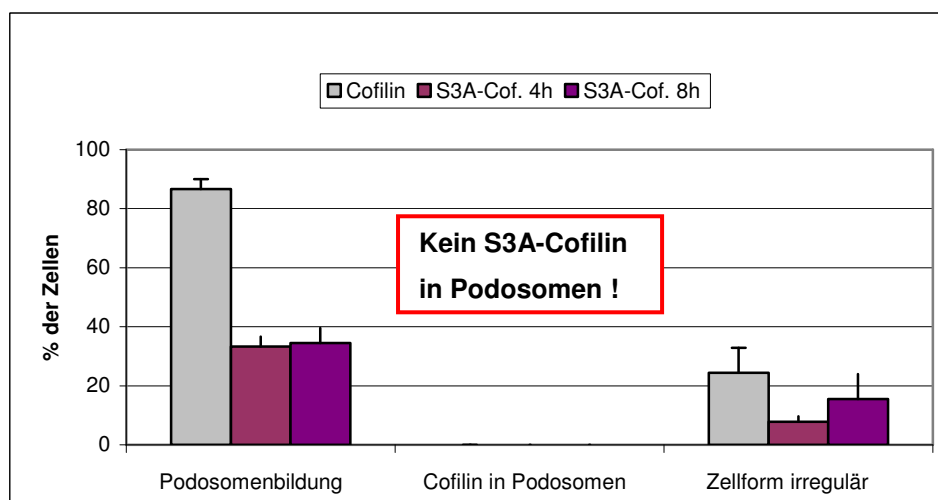


Abb. 3-2: Statistische Auswertung der Überexpression von Cofilin-GFP (A), S3D-Cofilin (B) und S3A-Cofilin in humanen Makrophagen (Einzelheiten s. Text)

Cofilin lokalisiert direkt im Podosom bzw. im direkten Podosomen-Umfeld. Für diese Lokalisation ist die Bindung an F-Aktin via Ser-3 unabdingbar. Eine konstitutive Cofilin Aktivierung führt zu einer verminderten Podosomen-Anzahl, wahrscheinlich durch vermehrten Podosomen-Abbau.

3.3 Bedeutung von PAK für die Podosomen-Bildung

Proteine der PAK-(*p21-activated kinases*) Familie haben als wichtige Effektoren der RhoGTPasen CDC42 und Rac die Fähigkeit, das Aktinzytoskelett zu reorganisieren (Manser et al., 1994). Bisher wurden insgesamt sechs Isoformen des PAK Proteins identifiziert, die aufgrund struktureller Unterschiede in zwei Untergruppen aufgeteilt werden können: PAK1-3 (Gruppe I) und PAK4-6 (Gruppe II) (Jaffer and Chernoff, 2002). PAK1 und PAK4 sind die am besten untersuchten Mitglieder dieser beiden Untergruppen. Beide sind an der Bildung von Zell-Substrat-Kontakten beteiligt und verbinden RhoGTPase Signalwege mit der Aktinzytoskelett-Organisation. Dafür scheint ihre Kinaseaktivität von entscheidender Bedeutung zu sein, die über eine Aktivierung von LIM-Kinasen zu einer Inaktivierung von Cofilin führt, was eine vermehrte Aktinbildung zur Folge hat (Sells et al., 1997; Dan et al., 2001).

3.3.1 PAK4 als physiologischer Podosomen-Regulator in primären humanen Makrophagen

Um Aussagen über die Relevanz von PAK1 und PAK4 für die physiologische Podosomenregulation machen zu können, wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation jeder Isoform bestimmt. Dazu wurden primäre humane Makrophagen mit jeweils einem polyklonalen Antikörper gegen PAK1 bzw. PAK4 inkubiert. Zusätzlich wurde jedes Präparat mit Alexa-568-gekoppeltem Phalloidin gefärbt, um die F-Aktin-reichen Podosomenkerne sichtbar zu machen. Anschließend erfolgte die Auswertung unter dem Konfokalmikroskop. Hierbei lokalisierte PAK4 in und um die F-Aktin-reichen Podosomenkerne, wohingegen PAK1 nicht mit diesen Strukturen assoziiert war (s. Abb. 3-3)

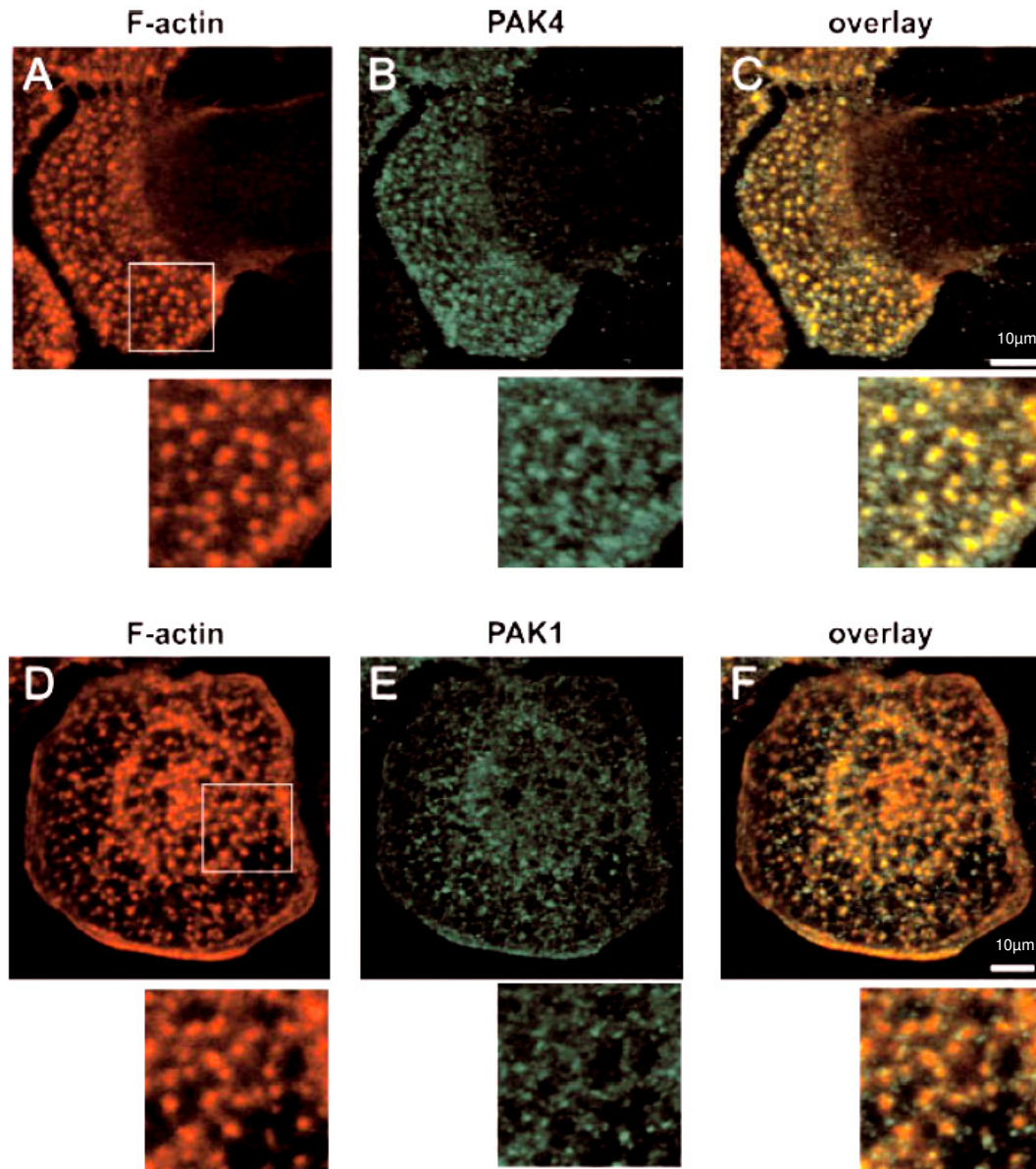


Abb. 3-3: Zelluläres PAK4, und nicht PAK1, kolokalisiert mit Podosomen.

(A-F) Konfokalmikroskopische Aufnahmen 7 Tage kultivierter Makrophagen.
 (A, D) F-Aktinfärbung mit Alexa-568-markiertem Phalloidin (rot)
 (B, E) PAK1 bzw. PAK4 mit spezifischen primären Antikörpern gefärbt (grün)
 (C, F) overlay A und B bzw. E und F; gelbe Färbung bedeutet Co-Lokalisation

Ausserdem wurden Makrophagen-Lysate mittels Western-Blot analysiert, um die Expression beider Isoformen zu untersuchen. Es zeigte sich, dass PAK1 und PAK4 als Polypeptide von entsprechender Größe (65 kDa für PAK1 und 68 kDa für PAK4) in humanen Makrophagen exprimiert wurden (s. Abb. 3-4).

Zur genaueren Bestimmung der subzellulären PAK Expression wurden Differentielle-Lyse-Experimente (s. 2.3.3.3) mit 7 Tage kultivierten Makrophagen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst durch einen schwachen Puffer lysiert und so die Zellkörper und das Zytoplasma abgetrennt. Durch mikroskopische Kontrollen wurde sichergestellt,

dass die Zellkörper vollständig durch den ersten Lyseprozeß entfernt waren und nur noch Adhäsionsstrukturen, wie beispielsweise Podosomen vorhanden waren. Nach mehrmaligem Waschen wurden diese mittels eines stärkeren, SDS-haltigen Lysepuffer und mit Hilfe eines *cell-scrapers* gelöst. Die beiden Zellfraktionen wurden dann im Hinblick auf die PAK1 und PAK4 Expression mittels Western Blot analysiert. Um auszuschließen, dass keine Verunreinigung der Podosomen-reichen Zellfraktion vorlag, wurde der Western Blot zusätzlich mit Antikörpern gegen Proteine, welche nicht in Podosomen vorkommen, wie z.B. β -Tubulin, durchgeführt. Es konnte demnach ausgeschlossen werden, dass die Podosomen-reiche Zellfraktion verunreinigt war.

Auch die differentielle Lyse bestätigte das Ergebnis der Immunfluoreszenz-Färbung: ein Teil des zellulären PAK4 Pools war mit der Podosomen-reichen, Adhäsions-vermittelnden Zellfraktion assoziiert. PAK1 hingegen zeigte kein vermehrtes Vorkommen in dieser Fraktion (s. Abb 3-4 B).

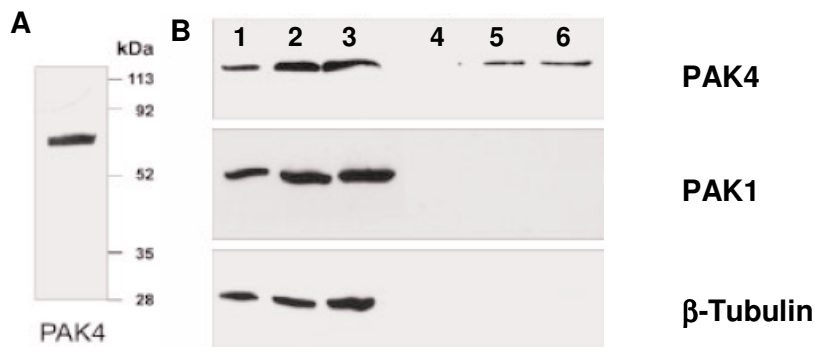


Abb. 3-4: PAK4 wird in primären humanen Makrophagen exprimiert. In der Podosomen-reichen Zellfraktion findet sich nur PAK4, nicht PAK1.

- (A) Western Blot; Detektion von PAK4 (68 kDa) mit einem anti-PAK4-Antikörper in 7 Tage alten Makrophagen
 (B) Western Blot; Differentiellen Lyse; Spuren 1-3: zytosolische Fraktion, Spuren 4-6: podosomale Fraktion in steigender Konzentration; Detektion von PAK4, PAK1 und β -Tubulin mit spezifischen Antikörpern

Die bisherigen Ergebnisse legten nahe, dass PAK4 und nicht PAK1, eine Rolle bei der Podosomenregulation spielt. Um herauszufinden, ob Unterschiede bezüglich der PAK1- und PAK4-mRNA-Expression zwischen frisch isolierten, nicht adhären (d.h. nicht Podosomen-haltigen) Monozyten und 7 Tage alten adhären (d.h. Podosomen-haltigen) Makrophagen bestehen, wurde ein *gene array* angefertigt. Dieser wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Reinhard Hoffmann (Pettenkofer Institut, München) und Dr. Petra Kopp aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die gesamte zelluläre RNA frisch isolierter Monozyten bzw. 7 Tage alter Makrophagen isoliert. Nach Bestimmung der Konzentration wurde die RNA anschließend fluoreszenzmarkiert und mit

den sog. *arrays* hybridisiert. Die Fluoreszenzintensität wurde gemessen und analysiert (s. 2.2.5).

In adhärenenten Makrophagen ist, im Vergleich zu frisch isolierten Monozyten, die mRNA Menge für PAK1 um den Faktor vier reduziert, wohingegen die mRNA Menge für PAK4 in beiden Zellen unverändert blieb (s. Tabelle 3-1).

Dieses Ergebnis ist ein Hinweis dafür, dass PAK1 keine entscheidende Rolle bei der Regulation von Adhäsionsstrukturen in reifen Makrophagen spielt.

Tabelle 3-1: *gene array* Daten

PAK-Isoform	Accession Nr.	Änderung ^a	Signifikanzniveau (p) ^b
PAK4	NM_005884	+ 0,1	0,9530
PAK1	NM_002576	- 4,2	0,0189

^a Die Änderung bezieht sich auf die unterschiedliche Genexpression in Monozyten- und Makrophagenkollektiven

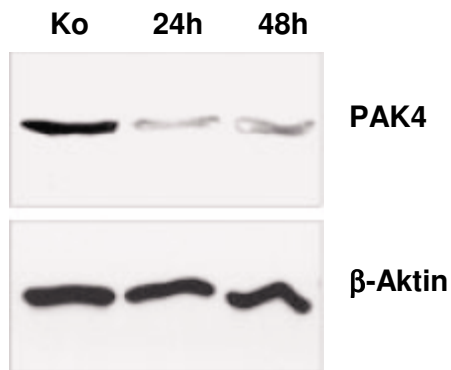
^b zugrundegelegt wurde ein ungepaarter einseitiger T-Test. $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet, was bedeutet, dass sich die Expressions-Levels der PAK Isoformen in Monozyten und Makrophagen signifikant unterscheiden. Umgekehrt zeigt der hohe p-Wert für PAK4, dass die PAK4-Expressions-Level in diesen beiden Zellgruppen nicht signifikant unterschiedlich sind.

3.3.2 Transfektion mit PAK4 shRNA führt zu einer Verminderung der Podosomenanzahl

Um Aussagen über die Bedeutung der zellulären PAK4-Expression für die Podosomenformation zu gewinnen, wurde ein PAK4 *knock down* mit der sog. RNAi Technologie durchgeführt (Übersicht bei Tuschl et al., 2001; Hannon et al., 2002; Tijsterman et al., 2002).

RNAi steht hierbei für *RNA interference*, eine Methode, die in den letzten Jahren zunehmend an Popularität gewonnen hat. Sie dient dem *knock down* der Genexpression auf mRNA Ebene. Dies geschieht mittels kleiner, ca. 20 Basenpaar-langer RNA Fragmente, der sog. siRNA (*small interfering RNA*). In dieser Arbeit wurde ein sog. Vektor-basiertes shRNA (*small hairpin*) System eingesetzt. Dazu wurde eine gegen PAK4 gerichtete Zielsequenz in den bicistronischen GFP-Vektor (psiSTRIKE) einkloniert. Das hat den Vorteil, dass transfizierte Zellen außer der RNA-Zielsequenz zusätzlich das GFP-Protein exprimieren und so leichter identifiziert werden können. Da Makrophagen eine zu geringe Transfektionseffizienz (10-20%) für biochemische Untersuchungen aufweisen, konnte der PAK4 *knock down* Effekt auf Makrophagen auf Einzelzellebene lediglich Immunfluoreszenz-mikroskopisch untersucht werden. Zum Funktionsnachweis der shRNA wurden Endothelzellen (*HUVEC: human umbilical vein endothelial cells*) eingesetzt, die auch Podosomen bilden können und eine höhere Transfektionseffizienz (ca. 90%) als Makrophagen aufweisen. In Abb. 3-5 zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle (Zeitpunkt „0“)

ein deutlich vermindertes PAK4-Signal nach 24h bzw. 48h PAK4-shRNA-Expression. Folglich ist durch den *knock down* die Proteinmenge vermindert und die shRNA damit funktionell. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.



:Abb. 3-5: PAK4 shRNA führt zu einer Reduktion der PAK4-Proteinmenge nach 24h und 48h

Western Blot von HUVEC, welche mit PAK4-shRNA transfiziert wurden. Die Zellen wurden jeweils zum Zeitpunkt 0h (= Ko; Kontrolle), 24h und 48h post-transfektionem lysiert. Verwendet wurden anti-PAK4 bzw. anti- β -Aktin Antikörper.

Für die Analyse auf Einzelzelebene und für die statistische Erfassung der Effekte wurden humane Makrophagen mit sh-PAK4 transfiziert, zu bestimmten Zeitpunkten fixiert und gegen F-Aktin gefärbt. Als Negativkontrolle diente ein sh-RNA Konstrukt, welches eine randomisierte Basenabfolge der Zielsequenz enthielt und deshalb nicht funktionell war (sog. *scrambled sequence*).

Leider machte die geringe Transfektionseffizienz (<10%) und die Vielzahl an geschädigten Zellen die statistische Auswertung der phänotypischen Änderungen im Verlauf unmöglich. Zwei Möglichkeiten diese Situation zu verbessern wurden zunächst getestet: zum einen ein Mediumwechsel (anstatt herkömmlichem Monozytenmedium jetzt Nährstoff-reicheres AIM-Medium), zum anderen durch Variation der transfizierten shRNA-Vektor Menge. Dies glich einer Gratwanderung zwischen zu hoher Toxizität für die Zellen und zu geringer Effektivität des *knock downs*. Auch eine Verbesserung der Adhäsion durch sog. *coverslip-coating* mit Kollagen, wie es bei Endothelzellen erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe praktiziert wird, brachte nicht den erhofften Erfolg. Nach einigen Testreihen zeigte sich das beste Ergebnis bei einer Konzentration von 1,3 bis 1,5 μ g PAK4-shRNA und anschließender Kultivierung mit AIM Medium.

Die statistische Auswertung der *knock down* Versuche erfolgte nach 8h, 24h, 36h und 48h. Kontrollzellen, transfiziert mit *scrambled* shRNA, erfuhren die gleiche Behandlung wie PAK4-shRNA transfizierte Zellen. 8h nach Transfektion zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollzellen noch keinerlei Veränderung der Podosomenformation, wohingegen der

Großteil der PAK4-shRNA-transformierten Zellen nach 48h bereits vom *coverslip* abgelöst war. Im Folgenden wurden die Zeitpunkte 24h, 36h und 48h für eine detaillierte Analyse des Podosomengehalts ausgewählt, da hier die Zellen noch adhärten. Nach 24h zeigten viele (80%) PAK4-shRNA-transfizierte Zellen noch einen normalen Podosomengehalt, die Anzahl der Zellen mit Podosomen war jedoch schon stark reduziert. Dieser Trend war nach 36h noch deutlicher ausgeprägt: über 90% der transformierten Zellen zeigten einen reduzierten Podosomengehalt, von denen über 60% weniger als 10 oder gar keine Podosomen mehr zeigten. Nach 48h war der Großteil der transfizierten Zellen bereits vom *coverslip* abgelöst, was die statistische Auswertung erschwerte. Dennoch zeigten auch hier deutlich über 90% der transfizierten Zellen einen signifikant niedrigeren Podosomengehalt, wovon jetzt sogar knapp 70% der Zellen weniger als 10 Podosomen pro Zelle exprimierten (s. Abb. 3-7A).

Diese Daten untermauern erneut die These, dass endogenes PAK4 ein wichtiger physiologischer Podosomen-Regulator in primären humanen Makrophagen ist.

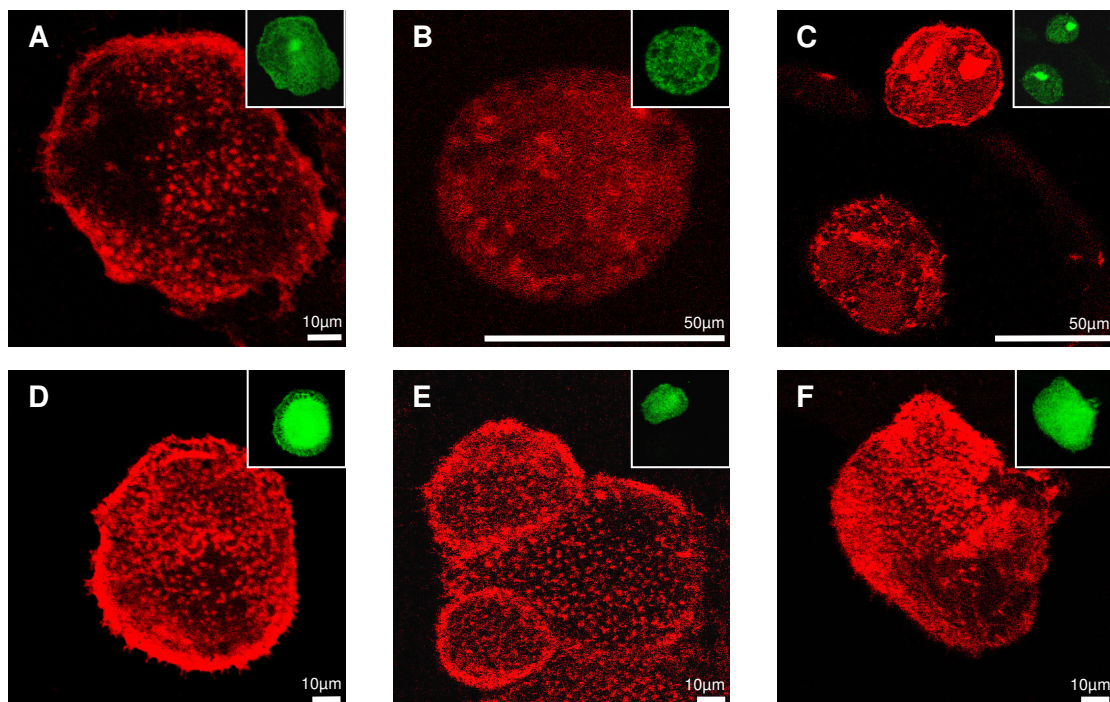


Abb. 3-6: Transfektion primärer humaner Makrophagen mit PAK4 shRNA führt zu einer Podosomen-Reduktion - konfokalmikroskopische Auswertung.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen transfizierter Zellen, F-Aktin (rot), Insets zeigen die transfizierten Zellen (GFP);

- (A-C): PAK4-shRNA nach 24h (A) - 36h (B) - 48h (C) Inkubation
 (D-F): scrambled shRNA (Kontrolle) nach 24h (D) - 36h (E) - 48h (G) Inkubation

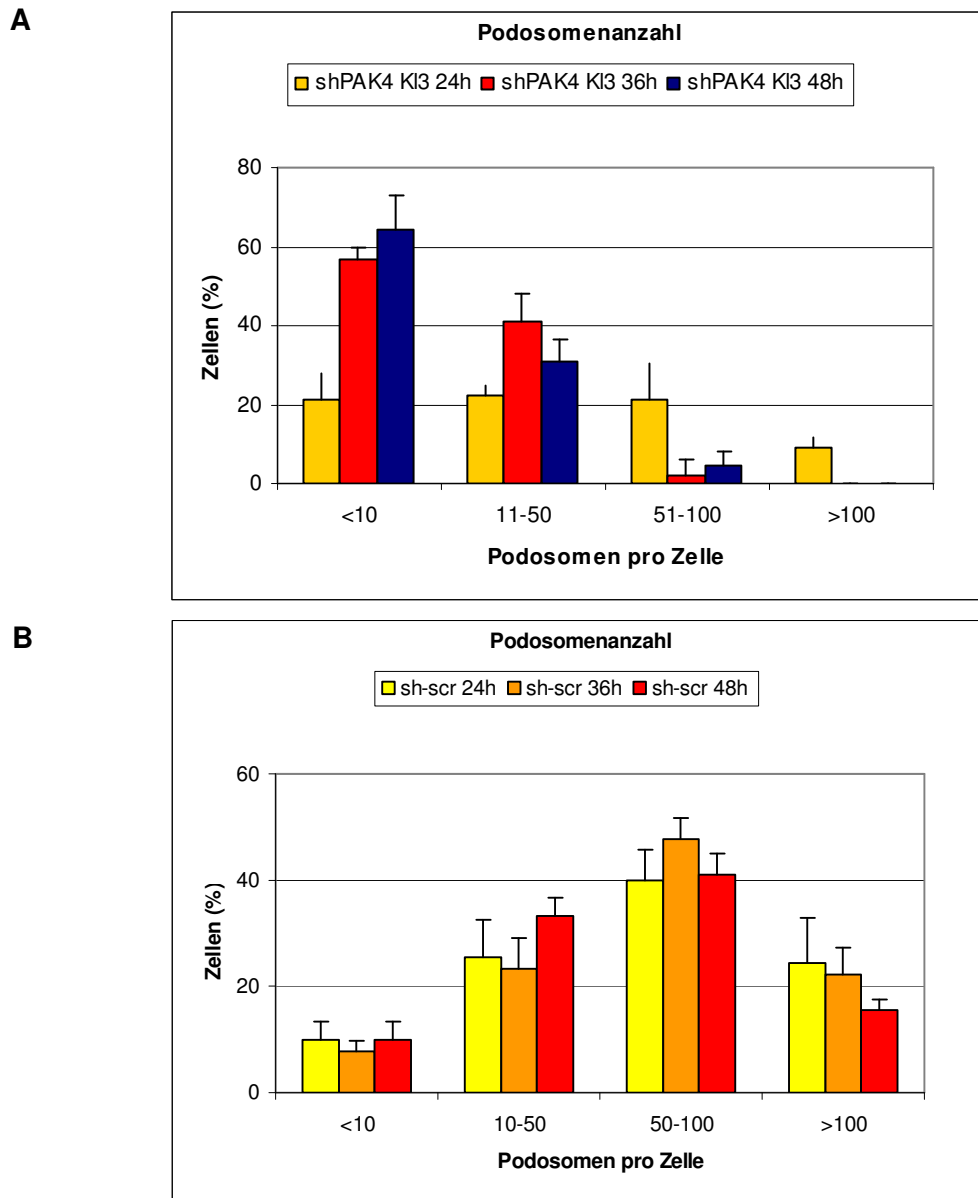


Abb. 3-7: Die Expression der PAK4-shRNA führt zu einer Verminderung der Podosomenanzahl - statistische Auswertung.

Statistische Auswertung der Podosomenzahl pro Zelle; 7 Tage alte Makrophagen transfiziert mit:

(A) PAK4-shRNA

(B) *scrambled* shRNA (Kontrolle)

3.3.3 Überexpression von PAK4 in primären humanen Makrophagen

Die Ergebnisse der biochemischen Analysen und zellulären Lokalisationsstudien sowie des *knock downs* machten die physiologische Relevanz von PAK4 für die Regulation von Podosomen in primären humanen Makrophagen deutlich. Nun sollten die Auswirkungen einer PAK4 Überexpression auf die Zellen untersucht werden. Durch unsere Kooperationspartnerin Dr. Audrey Minden (Department of Biological Sciences, Columbia

University, New York, USA) wurde uns ein bicistronisches PAK4-myc-GFP Konstrukt zur Verfügung gestellt. Allerdings stellte sich folgendes Problem: die PAK4-Sequenz ist in einen bicistronischen Vektor einkloniert, bei dem GFP nur als Transfektionsmarker fungiert, jedoch nicht als Fusionsprotein mit PAK4 vorliegt. Um exprimiertes PAK4 spezifisch zu lokalisieren, musste daher eine Färbung mit anti-myc-Antikörpern durchgeführt werden. Da die zurzeit kommerziell erhältlichen Antikörper für eine Anwendung in Makrophagen ungeeignet waren (Hintergrundfärbung), kam ein selbst hergestellter anti-myc-Antikörper von Dr. Ralf Gräf (Adolf-Butenand-Institut, LMU München) zum Einsatz. Dieser wurde auch bei den PAK4-KM und -NE Konstrukten mit Erfolg eingesetzt (s. 3.3.5), aber leider zeigte er beim PAK4-Wildtyp Konstrukt eine zu hohe Hintergrundfärbung, die eine spezifische Auswertung unmöglich machte. Deshalb erfolgte die Umklonierung der PAK4-Sequenz in einen GFP-Vektor durch unseren Kooperationspartner Dr. Georg Rosenberger (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Deutschland), so dass uns PAK4 als N- bzw. C-terminales GFP-Fusionskonstrukt vorlag. Mittels Transfektion wurde das neu hergestellte PAK4-GFP Konstrukt in primäre humane Makrophagen eingebracht und exprimiert. Als Kontrolle dienten primäre humane Makrophagen, die mit GFP-Leervektor transfiziert waren. Nach 4h, 8h und 24h erfolgte die Fixierung und nach anschließender F-Aktin Färbung mittels Alexa-568-markiertem Phalloidin eine konfokalmikroskopische Analyse. Wie schon bereits bei der Färbung des endogenen Proteins in untransfizierten Zellen, zeigte sich auch hier eine vermehrte Anreicherung des PAK4-GFP Konstruktes in Podosomennähe sowie eine partielle Co-Lokalisation mit den äußeren Bereichen der Podosomenkernregion. Wie auch schon früher durch Wells et al. beschrieben, konnte man PAK4 zusätzlich auch in der Zellperipherie beobachten (Wells et al., 2002; s. Abb. 3-8).

Es zeigte sich auch bezüglich der N- bzw. C-terminalen Lage der PAK4 Sequenz im GFP-Vektor kein Unterschied. Für die statistische Erfassung wurden die Zellen mit dem N-terminalen GFP-Vektor transfiziert. Die Überexpression des PAK4-Wildtyps hat im Vergleich zur Kontrolle weder einen erkennbaren Effekt auf die Morphologie noch auf die Anzahl der Podosomen. Lediglich eine vermehrte Podosomen-Aggregation und dadurch Bildung größerer *cluster* konnte in wenigen Fällen (<5%) beobachtet werden.

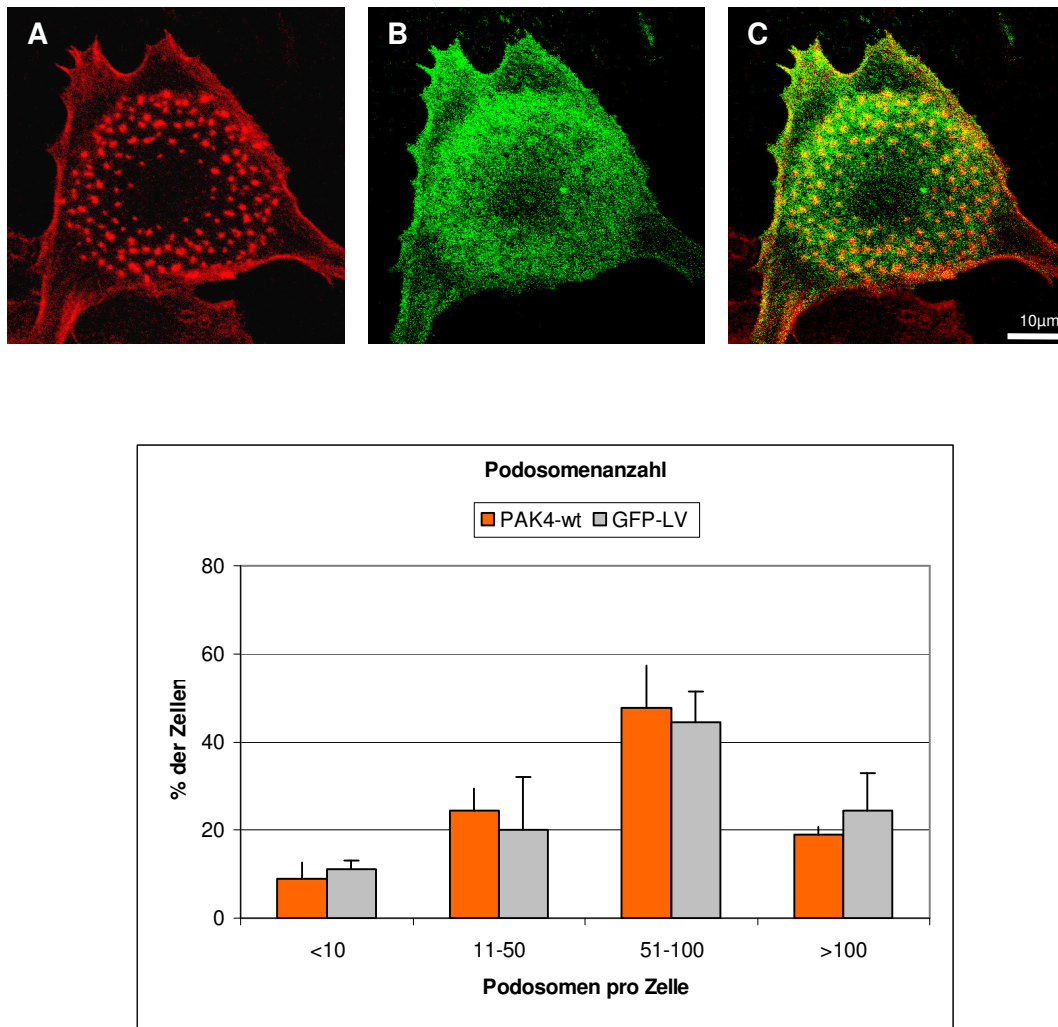


Abb. 3-8: GFP-PAK4 ist vermehrt an Podosomen lokalisiert und hat keine Auswirkung auf die Podosomen-Anzahl oder Morphologie.

(A-C): konfokalmikroskopische Aufnahmen eines 7 Tage kultivierten primären humanen Makrophagen, der mit PAK4-GFP transfiziert und nach 8h fixiert wurde. F-Aktin gefärbt mit Alexa-568-Phalloidin (A), GFP-PAK4 (B), overlay (C).

(D): Statistische Auswertung der Effekte von überexprimiertem PAK4 im Vergleich zur Kontrolle (GFP-Leervektor).

3.3.4 Überexpression von PAK4-Mutanten in primären humanen Makrophagen

Das PAK4-Protein besitzt eine multi-Domänen Struktur. Es kann demnach grob in einen regulatorischen und einen katalytischen Teil gegliedert werden. Beide Teile enthalten mehrere Domänen, die in Abb. 3-9 nochmals zusammengefasst sind. Der genaue Aufbau und die Funktionen sind in Kapitel 1.4 beschrieben. Am N-terminalen Ende ist die PBD (*protein binding domain*) lokalisiert, welche an der Bindung von RhoGTPasen beteiligt ist, im Zentrum des Proteins befinden sich einige Prolin-reiche Sequenzen und C-terminal

schließt sich die Kinase Domäne (KD) an. Dank unserer Kooperation mit Dr. Audrey Minden (Department of Biological Sciences, Columbia University, New York, USA) wurden uns verschiedene PAK4-Mutanten zur Verfügung gestellt. Im Weiteren sollten die spezifischen Effekte dieser Trunktationsmutanten auf primäre humane Makrophagen untersucht werden. Als Kontrolle diente in den folgenden Versuchen GFP-Leervektor.

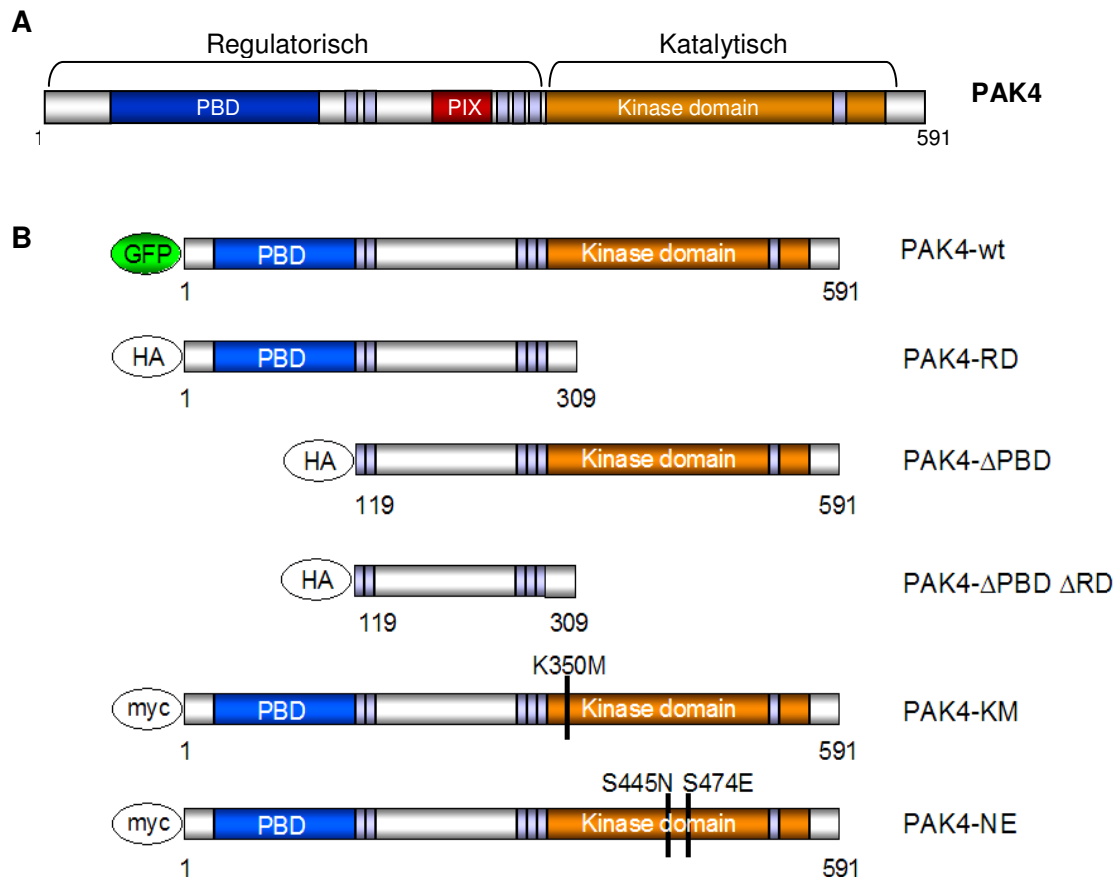


Abb. 3-9: Schematische Darstellung des PAK4 Proteins (A) und der eingesetzten PAK4-Konstrukte (B).

GFP:	grün fluoreszierendes Protein
HA:	Hämagglutinin-tag
myc:	myc Onkogen-tag
PBD:	<i>protein binding domain</i> (CDC42/Rac Bindung)
RD:	<i>regulatory domain</i>
wt:	<i>wildtype</i> (Wildtyp)
K350M:	Austausch von Lysin in Methionin an Position 350, der katalytischen Untereinheit, führt zu einem inaktiven PAK4-Konstrukt.
S445N/S474E:	kombinierter Austausch von Serin an Stelle 445 in Asparagin und Serin 474 der katalytischen Untereinheit in Glutamat, führt zu einem konstitutiv aktiven PAK4 Konstrukt.

Um den Einfluß der Kinase Domäne auf die Podosomen-Bildung und –Morphologie zu untersuchen, wurden primäre humane Makrophagen mit einem HA-markierten PAK4-RD

Konstrukt transfiziert, welches keine Kinase-Domäne enthält. Nach einer Expressionszeit von 4h, 8h und 24h wurden die Zellen fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen HA und mit Alexa-568-markiertem Phalloidin gefärbt. Es zeigte sich eine diffuse zytosolische Verteilung der Mutante, bei normaler Zellgestalt. Die Podosomen erschienen eher klein und unscharf begrenzt (s. Abb.3-10 A-C). Interessanterweise war die Anzahl der Podosomen pro Zelle im Gegensatz zur Kontrolle (GFP-LV) erhöht. Insbesondere zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Kollektivs mit mehr als 100 Podosomen pro Zelle auf Werte bis zu 40%; wohingegen nur etwa 25% der Kontrollzellen mehr als 100 Podosomen pro Zelle exprimierten. Weiterhin zeigt sich im Vergleich mit den Kontrollzellen auch eine signifikante Reduktion im Bereich weniger als 10 Podosomen pro Zelle (1% vs. 11%) (s. Abb 3-12). Diese Ergebnisse implizieren eine wichtige Rolle der Kinase Domäne hinsichtlich der Podosomenregulation. Deshalb wurden die Effekte zweier weiterer Mutanten der Kinase Domäne untersucht (s. 3.3.5).

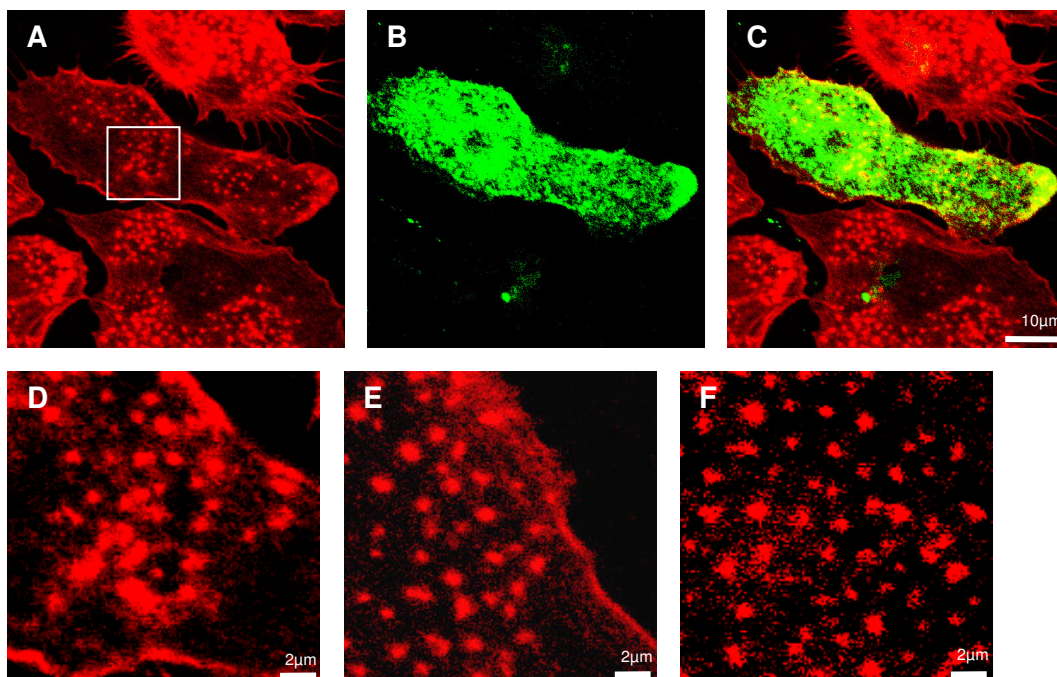


Abb. 3-10: PAK4-RD führt zu unscharfen Podosomengrenzen und einer Abnahme der Podosomen-Anzahl.

Konfokalmikroskopische Aufnahme eines primären humanen Makrophagen 4h nach Transfektion mit PAK4-RD-GFP.

(A) Aktinfärbung: Alexa 568-Phalloidin, (B) PAK4-RD-GFP, (C) overlay
(D) vergrößerter Bildausschnitt aus (A) im Vergleich mit PAK4-wt (E) und GFP-LV (F).

Auffallend sind die unscharf begrenzten Podosomen in PAK4-RD-GFP transfizierten Zellen.

PAK4 wird durch die Bindung der RhoGTPasen CDC42 oder Rac an die N-terminale PBD (*p-21 binding domain*) aktiviert. Zur Untersuchung der Rolle der RhoGTPase Bindung an PAK4 für die Podosomenbildung wurde eine (nicht mehr durch GTPasen aktivierbare) PBD-Trunkationsmutante in humanen Makrophagen überexprimiert. Zu beobachten war hier eine zytosolische Lokalisation des Konstrukts bei normaler Zellgestalt. Auffällig war, dass die Podosomen vermehrt in Clustern angeordnet zu sein schienen. Die zelluläre F-Aktinverteilung war normal (s. Abb 3-11 A). Dennoch konnte ein signifikanter Anstieg der Podosomenanzahl, v.a. in den Bereichen 11-50 und 51-100 Podosomen pro Zelle, verzeichnet werden, der besonders in den späteren Expressionsabschnitten (8h und 24h) akzentuiert war (s. Abb 3-12). Dies weist auf eine Rolle der RhoGTPase-vermittelten PAK4 Aktivierung bei der Podosomenregulation hin.

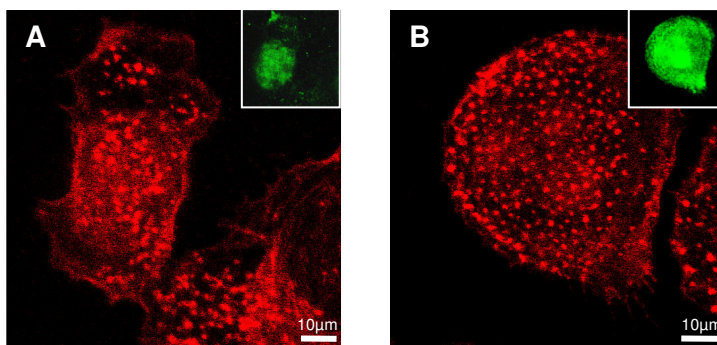


Abb. 3-11: PAK4- Δ PBD führt zur Bildung von Podosomen-Clustern und einer verminderten Podosomen-Anzahl.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen eines primären humanen Makrophagen. Aktinfärbung mit Alexa-568-Phalloidin.

- (A) Expression von PAK4- Δ PBD-HA. Insert: Färbung mit anti-HA Antikörper als Transfektionsmarker
- (B) Expression von GFP-Leervektor (Kontrolle). Insert: GFP-Expression als Transfektionsmarker

Das PAK4- Δ PBD- Δ KD Konstrukt stellt eine Mehrfach-Deletions-Mutante dar. So fehlt einerseits die PBD, wodurch das Protein nicht mehr durch RhoGTPasen aktiviert werden kann. Andererseits ist auch die Kinase-Domäne deletiert, so dass PAK4 keine Kinase-Aktivität mehr entfalten kann. Dieses Konstrukt konnte leider in mehrfach durchgeführten Versuchen aufgrund der enorm hohen Anzahl abgelöster, transfizierter Zellen nicht ausgewertet werden. Offensichtlich haben diese Deletionen einen derart gravierenden Einfluss auf die Zellphysiologie, der das Zellüberleben unmöglich macht.

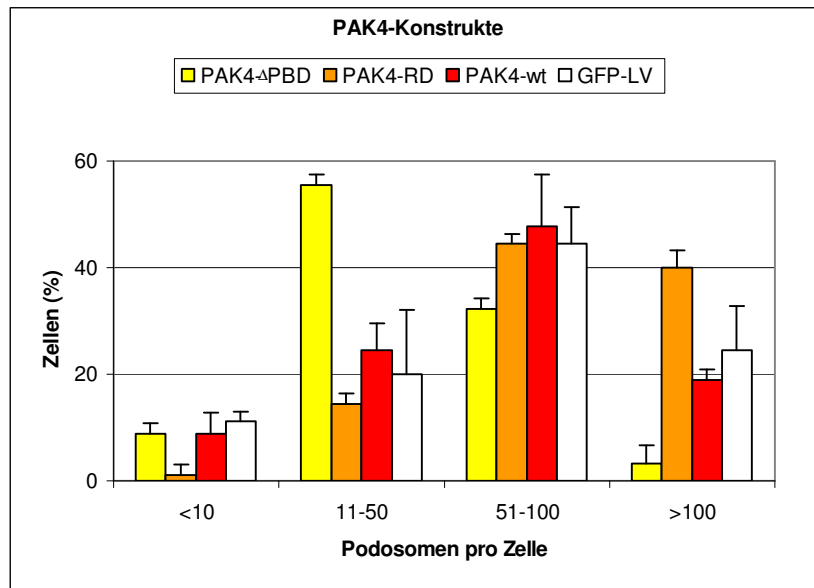


Abb. 3-12: Effekte der Überexpression von PAK4-Mutanten auf die Podosomen-Anzahl primärer humaner Makrophagen.

Statistische Auswertung von primären humanen Makrophagen transfiziert mit PAK4-ΔPBD, PAK4-RD und PAK4-GFP; Kontrolle: Überexpression des GFP-Leervektors. Einzelheiten siehe Text.

3.3.5 Einfluß der PAK4 Kinase Domäne auf die Podosomen-Bildung

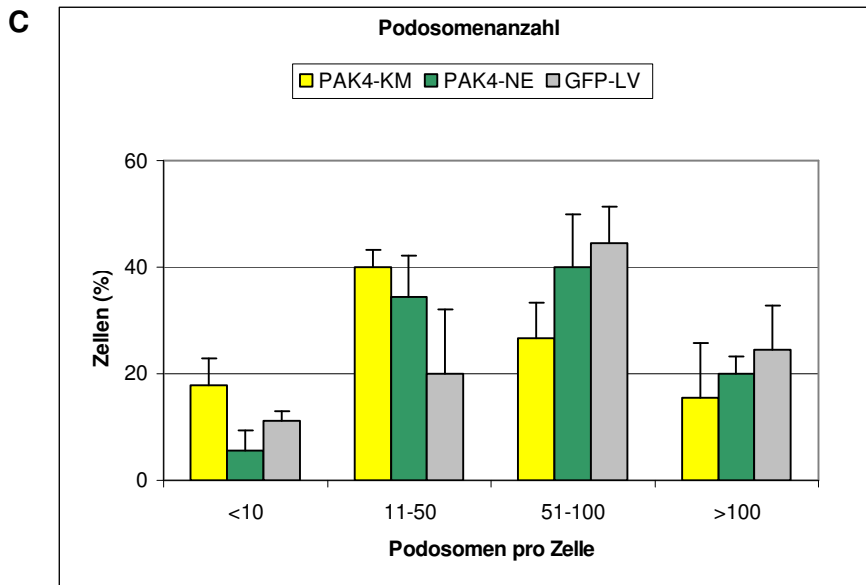
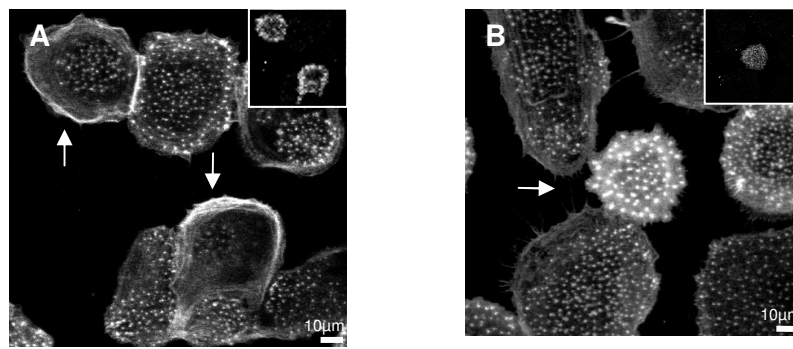
Die PAK-vermittelte Aktinreorganisation kann durch Kinase-abhängige und Kinase-unabhängige Wege vermittelt werden (Sells et al., 1997). Dass die Kinase Domäne von besonderer Bedeutung für die PAK4-Funktion und damit für die CDC42-vermittelte Aktinregulation ist, wurde auch bereits von Abo et al. für Endothelzellen gezeigt (Abo et al., 1998).

Bei der Überexpression der PAK4-RD-Trunkationsmutante (keine Kinase Domäne) zeigten sich bereits deutliche Effekte bezüglich der Podosomenanzahl und auch der Podosomengestalt (s. 3.3.4). Um die Einflüsse der PAK4-Kinaseaktivität auf die Podosomen-Bildung genauer zu untersuchen, wurden zwei weitere Mutanten der Kinase-Domäne in primären humanen Makrophagen überexprimiert. Zum einen war dies PAK4-KM, eine Kinase-inaktive Mutante (K350M). Zum anderen PAK4-NE, ein Konstrukt, welches eine Doppelmutation enthält und dadurch konstitutiv aktiv ist (S445N; S474E). Die Zellen wurden mit der jeweiligen Mutante, bzw. GFP-Leervektor als Kontrolle, transfiziert, nach 4h, 8h und 24h fixiert und F-Aktin mit Alexa 568-markiertem Phalloidin gefärbt.

PAK4-KM, die Kinase-inaktive Mutante, zeigte bei normaler Zellgestalt der Makrophagen eine weitgehend zytosolische Verteilung, in einigen Fällen konnte man eine Co-Lokalisation des Konstrukts mit F-Aktin in der Zellperipherie beobachten. Die Zellen weisen insgesamt eine unscharfe, schlechter sichtbare Aktinfärbung auf. Auch die

Podosomen sind, im Vergleich zur GFP-Kontrolle, von kleinerer Gestalt, schwächerer Leuchtkraft, und auch zahlenmäßig weniger stark vertreten. Über 55% der Zellen hatten im Vergleich zur GFP-Kontrolle weniger als 50 Podosomen (s. Abb 3-13 C).

Im Gegensatz zur Kinase-inaktiven Mutante PAK4-KM steht das konstitutiv aktive PAK4-NE Konstrukt. Die Zellen wirkten eher kleiner und verkrampft, was möglicherweise ein Indiz für ihre Beeinträchtigung aufgrund der Toxizität des Konstrukts sein kann. Auffällig ist hierbei, dass die Zellen ungewöhnlich große Podosomen aufwiesen, die auch in sehr kleinen gekrampften Makrophagen vorhanden waren. Das könnte möglicherweise auf einen Podosomen-stabilisierenden Effekt des Konstrukts zurückzuführen sein. Die Podosomen erschienen größer und leuchtender d.h. mit einem höheren F-Aktin Gehalt bei insgesamt verminderter Podosomen-Anzahl (s. Abb. 3-13).



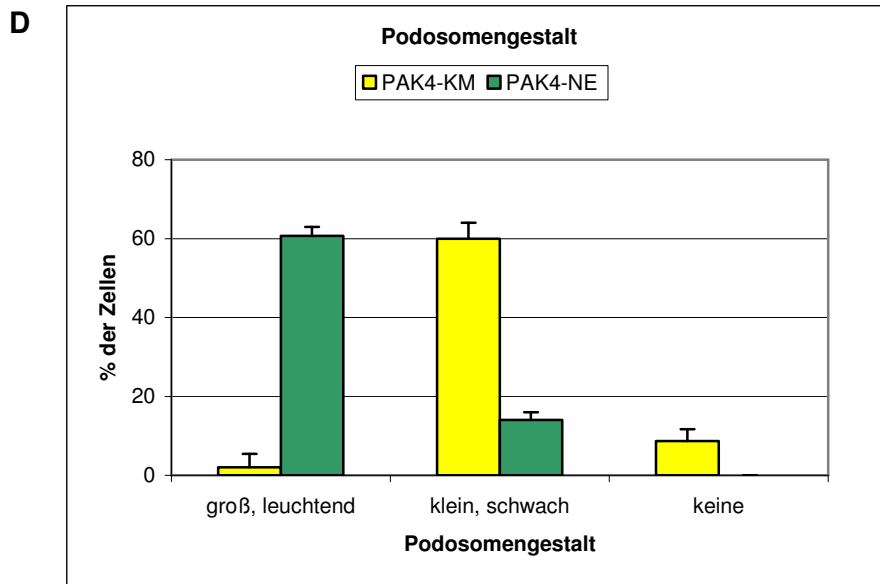


Abb. 3-13: Effekte der PAK4-Kinasevarianten PAK4-KM und PAK4-NE auf die Podosomenformation

- (A-B) 7 Tage alte Makrophagen 7h *post transfectionem* mit PAK4-KM (A) bzw. mit PAK4-NE (B); Aktinfärbung mit Alexa568-Phalloidin. Inserts: transfizierte Zellen (anti-myc gefärbt)
- (C) Statistische Auswertung des Einflusses auf die Podosomenanzahl
- (D) Statistische Auswertung des Einflusses auf die Podosomengestalt

Auffällig sind die Unterschiede hinsichtlich der Podosomengestalt. Transfektion mit PAK4-KM führt zu kleineren unscheinbaren Podosomen, wohingegen Überexpression von PAK4-NE große leuchtende Podosomen erzielt.

Um subjektive, Beobachter-abhängige Beeinflussungen des Ergebnisses zu minimieren, wurden diese qualitativen Unterschiede der Kinase-Mutanten auch quantitativ bezüglich der Fluoreszenzintensität evaluiert. Dazu wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen von transfizierten Zellen ohne Veränderung von Laserintensität und Bildgröße (zur direkten Vergleichbarkeit) angefertigt und anschließend mit der ImageJ 1.29x Software analysiert. Mit dieser Software war es möglich die gesamte F-Aktin-Fluoreszenzintensität einzelner Podosomen mit Hilfe von Schablonen einer bestimmten Größe (60 Pixel) zu messen. Die bereits qualitativ gewonnenen Eindrücke bezüglich der Podosomenleuchtkraft konnten somit auch quantitativ bestätigt werden. So zeigten Zellen, die PAK4-KM exprimierten eine >50%ige Reduktion der F-Aktin-basierten Fluoreszenzintensität, wohingegen man bei PAK4-NE transfizierten Zellen eine Zunahme der Leuchtintensität/des F-Aktingehalts um 100% messen konnte (s. Abb 3-14).

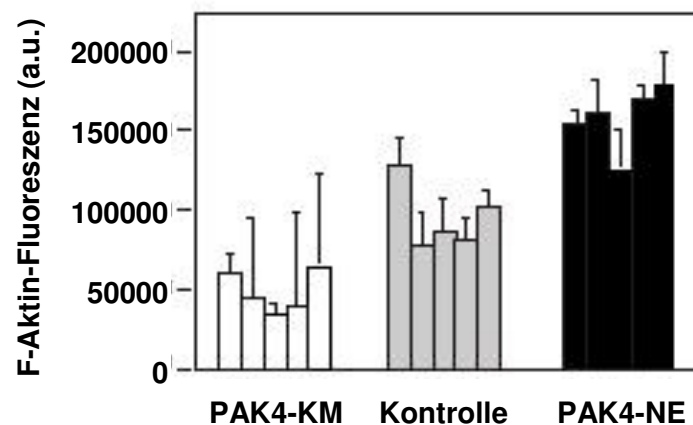


Abb. 3-14: Statistische Evaluation der F-Aktin-Fluoreszenzintensität in primären humanen Makrophagen, die PAK4-KM bzw. PAK4-NE exprimieren.

Jeder Balken repräsentiert 10 Podosomen einer einzelnen Zelle. Kontrolle GFP-Leervektor. a.u.: arbitrary units (freigewählte Größe)

Die bisherigen Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu: PAK4 wird in primären humanen Makrophagen exprimiert und zeigt, im Gegensatz zu PAK1, eine partielle Co-Lokalisation mit Podosomen. Mit der differentiellen Lyse konnte bestätigt werden, daß PAK4 größtenteils mit der Podosomen-reichen Zellfraktion assoziiert ist. Durch PAK4 *knock down* Versuche konnte die besondere funktionelle Relevanz des Proteins für die Podosomenbildung bestätigt werden. Expression von PAK4-Deletionsmutanten bewirkt v.a. eine Veränderung der Podosomenanzahl. PAK4 Mutanten mit einer konstitutiv aktiven bzw. einer inaktiven Kinase Domäne zeigen neben einer Reduktion der Podosomenanzahl, auch einen Einfluß auf die Größe und den F-Aktin Gehalt der Podosomenkerne. Die bisherigen Ergebnisse der PAK4-Expressionskonstrukte sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Übersicht der Effekte von PAK4-Expresssionskonstrukten auf primäre humane Makrophagen

Konstrukt	Beschreibung	Effekt
PAK4-GFP	Wildtyp	Keine Beeinflussung der Podosomenanzahl und -größe, gelegentlich Cluster-Bildung
PAK4-RD	Ohne Kinasedomäne	Erhöhung der Podosomenanzahl Unscharfe Begrenzung der Podosomen
PAK4-ΔPBD	Ohne PBD	Starke Abnahme der Podosomenanzahl

PAK4-KM	Kinase inaktiv	Reduktion der Podosomenanzahl Podosomen klein mit wenig F-Aktin
PAK4-NE	Konstitutiv aktiv	Reduktion der Podosomenanzahl Podosomen groß mit viel F-Aktin, <i>Cluster</i> -Bildung
PAK4- Δ PBD- Δ KD	Ohne PBD, ohne KD	Keine Evaluation möglich, wahrscheinlich letal

3.4 Bedeutung von α PIX für die Podosomen-Bildung

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben, spielen RhoGTPasen eine fundamentale Rolle bei einer Vielfalt von zellulären Prozessen, die durch extrazelluläre Stimuli initiiert werden. Unter anderem sind sie entscheidend an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt (Aspenstrom et al., 2004; Jaffe and Hall, 2005). Die Mitglieder der PIX Familie fungieren durch ihre GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) -Aktivität als Aktivatoren der RhoGTPasen, indem sie GDP gegen GTP austauschen. Auch die Aktivität von PAK kann durch PIX reguliert werden. PIX Proteine können demnach auf verschiedenen Ebenen RhoGTPase- und PAK-abhängige Signalwege regulieren. Dabei scheinen die drei bisher bekannten Isoformen der PIX Protein-Familie unterschiedliche Auswirkungen auf PAK-abhängige Signalwege zu haben. So kann p50- β PIX die CDC42/Rac induzierte PAK Aktivität inhibieren, wohingegen p85- β PIX einen permissiven Effekt auf die PAK Stimulation zeigt, aber unfähig ist PAK selbst zu aktivieren (Bagrodia et al., 1998). Für α PIX wurde hingegen gezeigt, dass es PAK stark aktivieren kann (Daniels et al., 1999; Feng et al., 2002).

PIX Proteine scheinen auch die subzelluläre PAK-Lokalisation zu beeinflussen. So ist β -PIX als Bestandteil eines Multi-Protein-Komplexes daran beteiligt PAK an fokale Adhäsionen zu translozieren (Matafora et al., 2001; Paris et al., 2002). Diesem, aus α und β PIX, PAK, GIT1 und weiteren assoziierten Proteinen bestehenden Proteinkomplex, werden noch weitere Funktionen bzgl. der Regulation des Aktinzytoskeletts zugesprochen. Webb et al. zeigte, dass die Überexpression von β -PIX einen Podosomen-induzierenden Einfluß in glatten Muskelzellen entfaltete (Webb et al., 2005). Jedoch wurde der Einfluß von α PIX auf die Podosomen-Bildung bisher noch nicht untersucht.

3.4.1 α PIX Lokalisation in primären humanen Makrophagen

Die Wichtigkeit von PAK4 für die Podosomen-Bildung in primären humanen Makrophagen wurde im Abschnitt 3.3 bereits dargestellt. Um mögliche PAK-Regulatoren an Podosomen genauer zu untersuchen, wählten wir ein in diesem Zusammenhang noch nicht

untersuchtes Mitglied der PIX Familie, α -PIX, welches PAK-aktivierende Eigenschaften besitzt (Daniels et al., 1999; Feng et al., 2004).

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von endogem α PIX erfolgte die Aktinfärbung mit Alexa-568-markiertem Phalloidin und die PIX Färbung mit einem kommerziell erhältlichen anti-PIX-Antikörper, der beide Isoformen, α PIX und β PIX, erkannte. Die Auswertung erfolgte unter dem Konfokalmikroskop. PIX lokalisiert an der ventralen Zellseite, hier speziell in den Regionen, die Podosomen enthalten und an der Basis von Retraktionsfasern (s. Abb. 3-15 A-C)

Um zu bestimmen, welche der PIX-Isoformen in primären humanen Makrophagen exprimiert werden, wurde ein Western Blot angefertigt. 7 Tage alte primäre humane Makrophagen wurden lysiert und die jeweiligen PIX Isoformen mit einem pan-PIX-Antikörper detektiert. Das Ergebnis zeigt, dass alle drei Isoformen exprimiert werden.

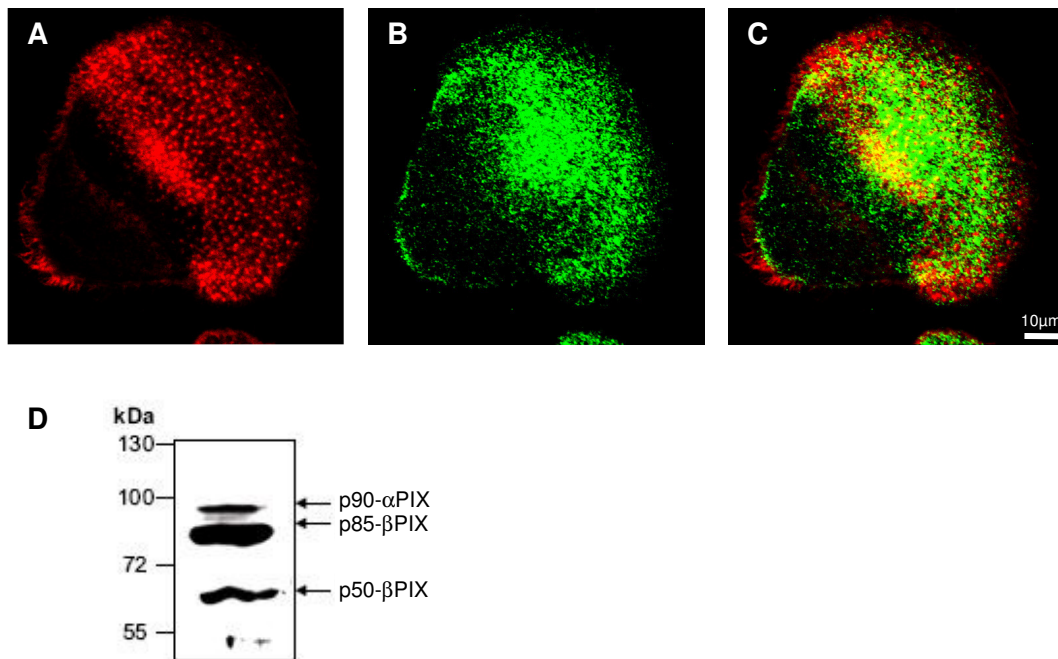


Abb. 3-15: PIX wird in primären humanen makrophagen exprimiert und lokalisiert an Podosomen.

- (A-C) Konfokalmikroskopische Aufnahmen 7 Tage alter Makrophagen. Färbung F-Aktin (A), Pan-PIX (B) und overlay (C).
 (D) Western Blot primärer humaner Makrophagen, Detektion aller drei PIX-Isoformen: p50- β PIX, p85- β PIX und p90- α PIX.

3.4.2 α PIX Überexpression in primären humanen Makrophagen

Durch eine Kooperation mit Dr. Kerstin Kutsche (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Deutschland) standen uns verschiedene α PIX Expressionskonstrukte zur

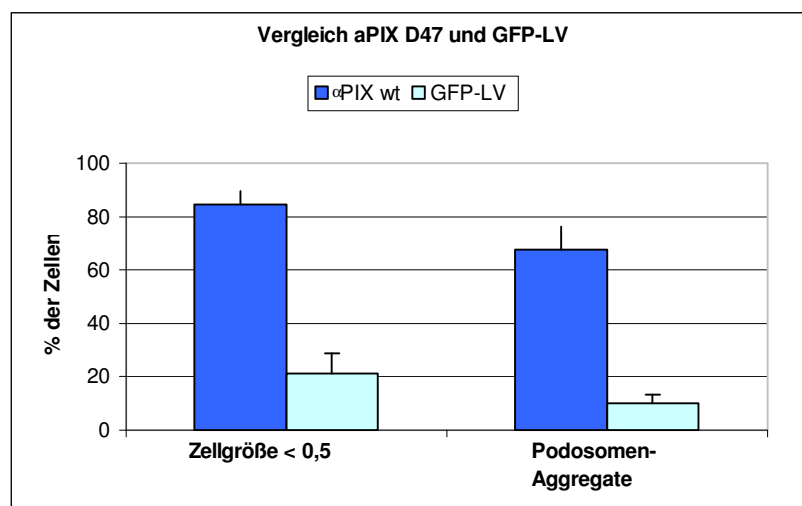
Verfügung. Allen voran der α PIX-Wildtyp als GFP-Fusionskonstrukt, jeweils als N-terminales und C-terminales Fusionsprotein.

Durch Transfektion wurden beide Konstrukte in 7 Tage alten primären humanen Makrophagen eingebracht, nach einer Expressionszeit von 4h, 8h und 24h fixiert und F-Aktin mit Alexa-568 Phalloidin gefärbt.

Die konfokalmikroskopische Auswertung zeigte keine nennenswerten phänotypischen Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation der beiden Konstrukte. Im Weiteren wurden die Zellen mit C-terminal fusioniertem α PIX- GFP transfiziert. Als Kontrolle diente der GFP-Leervektor (s. Abb. 3-16).

Wie bereits bei der Antikörper-Färbung des endogen produzierten Proteins zeigte sich auch bei der Überexpression eine Anreicherung an Podosomen, Lamellipodien des *leading edge* und Retraktionsfasern des *trailing edge*. α PIX lokalisierte in einer ringförmigen Art und Weise an Podosomen. Dies erinnert an die Verteilung von Komponenten des Podosomenrings wie z.B. Paxillin oder Vinkulin (Linder and Aepfelbacher, 2003). Daraufhin wurde eine Co-Färbung mit einem monoklonalen Paxillin-Antikörper vorgenommen, welche diese Beobachtung auch bestätigte. Paxillin co-lokaliserte mit α PIX in der podosomal Ringstruktur von primären humanen Makrophagen (s. Abb.3-16 E-G).

Im Vergleich zu den Kontrollzellen waren die Zellen, die α PIX-GFP überexprimierten deutlich kleiner und zeigten des öfteren Podosomen-Aggregate (s. Abb. 3-16 A).

A

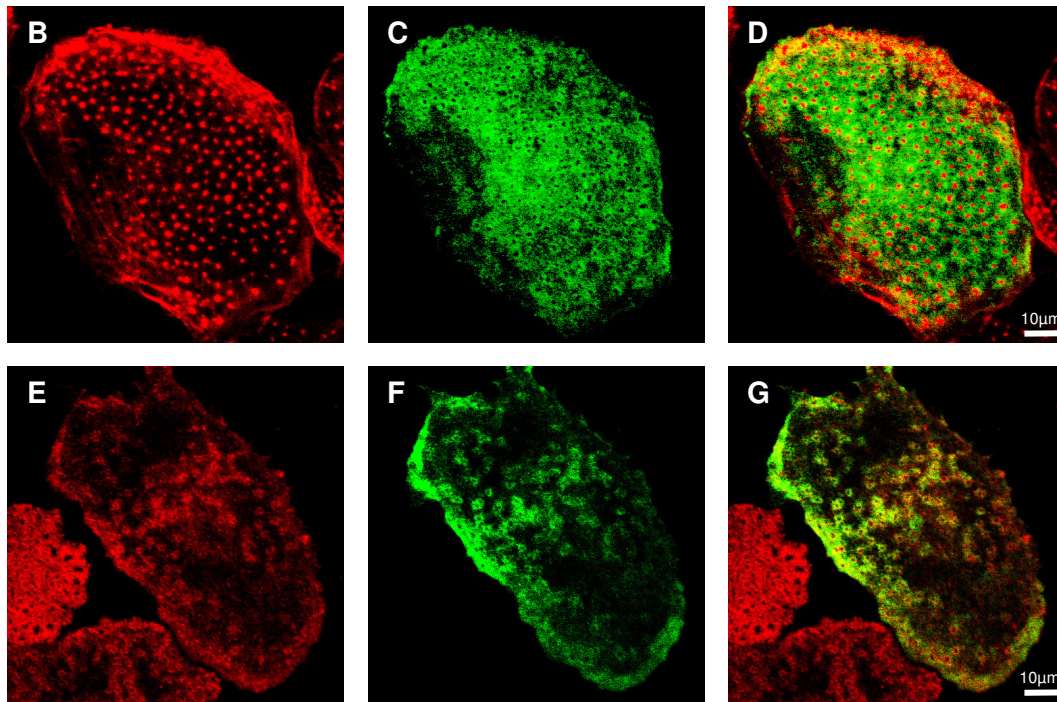


Abb. 3-16: Überexpression von α -PIX-GFP. Co-Lokalisation von α -PIX-GFP mit Paxillin, einem Protein der Podosomen-Ringstruktur.

- (A): Statistische Evaluation der α PIX-GFP Effekte in primären humanen Makrophagen
 (B-G): konfokalmikroskopische Aufnahmen 7 Tage alter Makrophagen.
 (B-D): Aktinfärbung: Alexa-568-Phalloidin (B), α PIX –GFP (C), overlay (D)
 (E-G): anti-Paxillin Färbung (E), α PIX-GFP (F), overlay (G)

3.4.3 Überexpression von α PIX-Mutanten in primären humanen Makrophagen

Das α PIX-Protein zeigt eine multi-Domänen Struktur. Zu nennen sind hier v.a. die N-terminale SH3-(*src homology 3*) Domäne, die die Bindung an PAK vermittelt, neben einer zentralen DH (*Dbl homology*) Domäne, die an der Aktivierung von CDC42 und Rac1 beteiligt ist (Bagrodia et al., 1998; Manser et al., 1998; Baird et al., 2005). Die C-terminal gelegene GBD (*GIT1-binding domain*) ist für die Bindung von GIT1 (*G-protein coupled receptor kinase interactng protein target*) verantwortlich. Um detailliertere Informationen über die Rolle von α PIX bezüglich der Podosomenformation zu gewinnen, wurden verschiedene α PIX-Polypeptide in primären humanen Makrophagen exprimiert und der Einfluß auf die Podosomenbildung beobachtet.

Eine Übersicht der exprimierten α PIX-Polypeptide findet sich in Abb. 3-17.

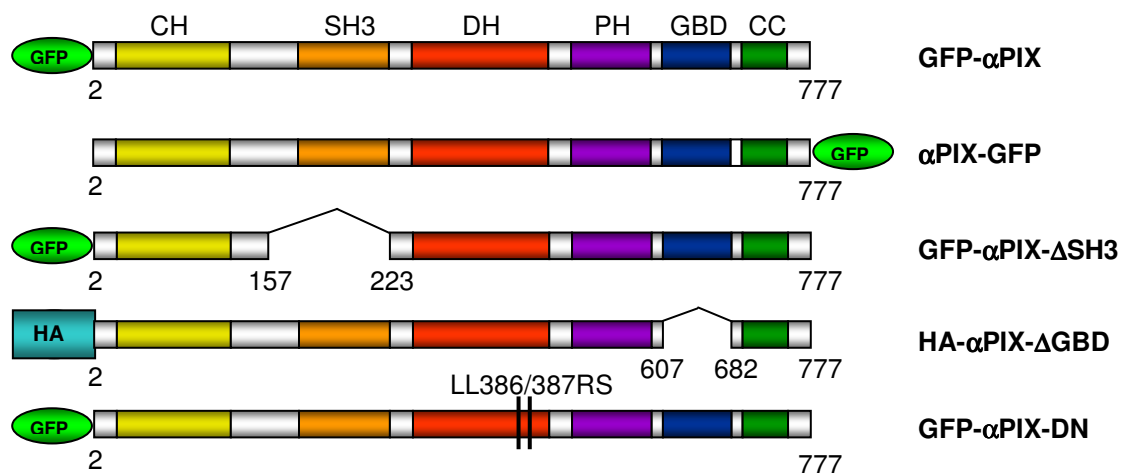


Abb. 3-17: Schematische Darstellung der αPIX-Expressionskonstrukte

GFP	grün fluoreszierendes Protein
HA	Hämagglutinin-tag
CH	<i>calponin homology</i> : β-Parvin Bindung
SH3	<i>src homology 3</i> : PAK Bindung
DH	<i>dbl homology</i> : Calpain Bindung
PH	<i>pleckstrin homology</i> : Calpain Bindung
GBD	<i>GIT1-binding domain</i>
CC	<i>coiled coil</i> : Homo-/Heterodimerisierung
DN	dominant negatives αPIX durch den Austausch von Leucin an Stelle 386 und 387 gegen Arginin (386) bzw. Serin (387)

7 Tage alte primäre humane Makrophagen wurden mit dem jeweiligen Konstrukt transfiziert und nach 4h, 8h und 24h fixiert. Es folgte die Aktin-Färbung mit Alexa-568-Phalloidin und bei HA-getaggten Konstrukten die Färbung mit dem anti-HA-Antikörper. Anschließend wurden die Zellen unter dem Konfokalmikroskop analysiert. Als Kontrolle dienten in den folgenden Versuchen 7 Tage alte primäre humane Makrophagen, die mit GFP-Leervektor transfiziert wurden.

αPIX bindet über die SH3-Domäne an PAK4 und führt so zu dessen Aktivierung und Translokation an fokale Adhäsionen (Mott et al., 2005; Rosenberger et al., 2006). Daher wurde der Einfluß von einer SH3-Deletionsmutante auf die Podosomengestalt und –anzahl untersucht. Zu Beginn dieser Arbeit stand uns bereits ein HA-getaggtes αPIX-ΔSH3 Konstrukt zu Verfügung. Allerdings führte dieses Konstrukt zu nicht verwertbaren Ergebnissen: in der HA-Färbung waren transfizierte Zellen nicht von Normalzellen zu unterscheiden und die Zellen zeigten unabhängig von der Expressionszeit Adhäsionsdefekte, d.h. sie lösten sich schnell ab. Zur Problembehebung wurden neben der Variation der transfizierten DNA-Menge, verschiedene anti-HA-Antikörper und Fixationsmethoden erfolglos getestet. Als letzte Möglichkeit blieb die Umklonierung in den

GFP-Vektor um herauszufinden, ob das Konstrukt toxisch für die Zellen war, oder ob der HA-tag fehlerhaft exprimiert oder angefärbt wurde. Dr. Georg Rosenberger (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Deutschland) stellte die α PIX- Δ SH3-Mutante als N- sowie C-terminales GFP-Fusionskonstrukt her. Primäre humane Makrophagen wurden damit transfiziert, nach 4h, 8h, 24h fixiert und anschließend mit Alexa-568-markiertem Phalloidin, zur Darstellung der F-Aktin-reichen Podosomenkerne, gefärbt.

Im Vergleich zu den Kontrollzellen (GFP-Leervektor) zeigten mit α PIX- Δ SH3-transfizierte Makrophagen deutliche phänotypische Unterschiede. Die transfizierten Zellen waren kleiner und zeigten neben einer zytosolischen Lokalisation eine ringförmige Anreicherung des Proteins um Podosomen. Die Podosomenbildung war deutlich gestört, somit konnte keine Auswertung hinsichtlich der Podosomen-Anzahl pro Zelle erfolgen, sondern lediglich bezüglich der Bildung von Podosomen-Clustern und der Zellgröße. Es konnten Unterschiede des Phänotyps der Podosomen in Abhängigkeit von der Expressionstärke des Konstrukts festgestellt werden: so zeigten sich zunächst unscharfe Podosomengrenzen, dann kam es zur Podosomen-Cluster Bildung und schließlich zum Verschwinden der Podosomen und einer Reduktion des F-Aktingehalts (s. Abb.3-18). Es konnten keine Unterschiede bzgl. der beiden Konstrukte (N- und C-terminales Fusionskonstrukt) festgestellt werden.

Die statistische Auswertung bestätigte diese Eindrücke: über 80% der transfizierten Zellen waren nur halb so groß oder kleiner als die Kontrollzellen und zeigten in der Hälfte der Fälle Podosomen-Aggregate (s. Abb. 3-18). Die Tatsache, dass sehr ähnliche Ergebnisse auch bei Zellen zu sehen waren, die das α PIX-Wildtyp Konstrukt überexprimierten, deutete darauf hin, dass diese Effekte unabhängig von der SH3 Domäne sind.

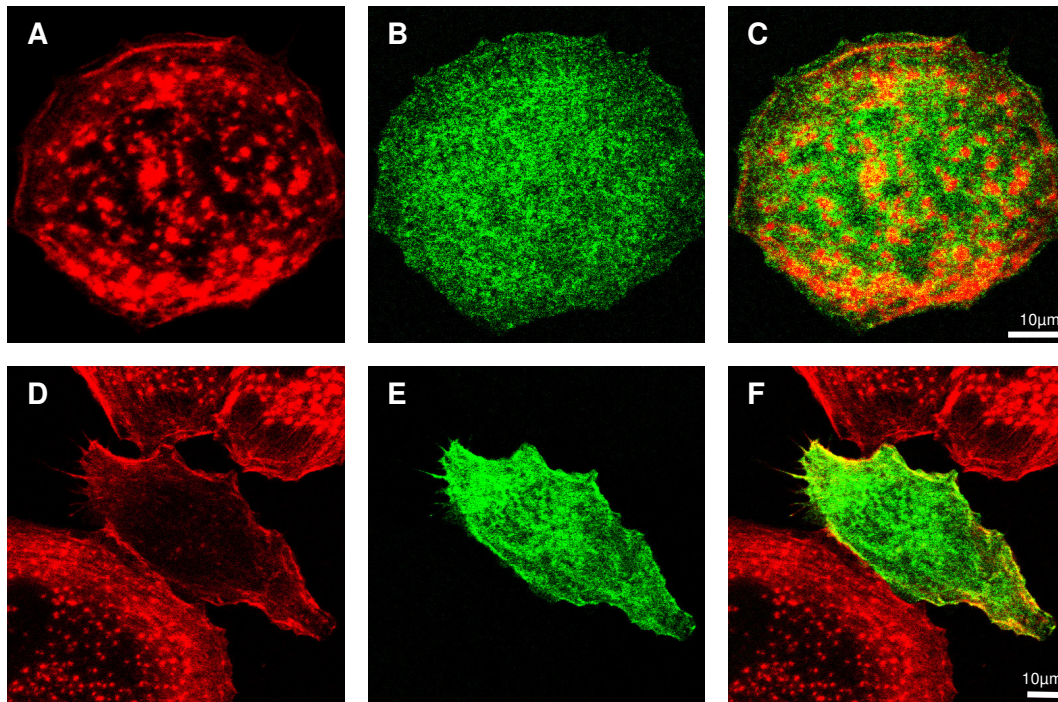
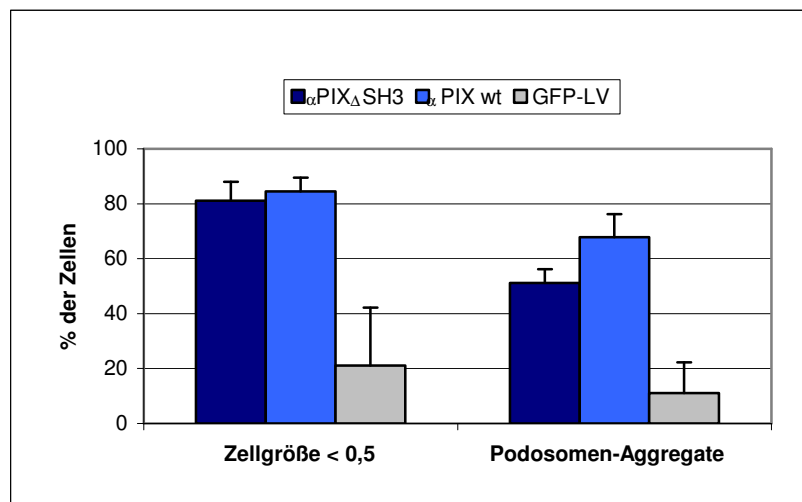


Abb. 3-18: α -PIX- Δ SH3 führt zu Podosomen-Aggregaten oder zum Podosomen-Verlust in primären humanen Makrophagen.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen 7 Tage alter Makrophagen transfiziert mit α PIX- Δ SH3-GFP (B, E). Aktinfärbung mit Alexa-568 Phalloidin (A, D, C, F), overlay (C,F). Statistische Auswertung (G)

G



Wie bereits unter Punkt 1.7 beschrieben, ist α PIX zusammen mit GIT1 und Paxillin ein Bestandteil des Multiproteinkomplexes, der PAK an fokale Komplexe rekrutieren kann. Die Grundlage dieses Komplexes bildet die Bindung von GIT1 an PIX (Übersicht bei Rosenberger et al., 2006).

Im Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit der mögliche Einfluß dieser Interaktion auf die Podosomenbildung primärer humaner Makrophagen untersucht. Hierzu wurde eine α PIX- Δ GBD Deletionsmutante, die nicht mehr über GIT1 an Paxillin binden kann, in primären humanen Makrophagen überexprimiert. Die Zellen wurden nach 4h, 8h und 24h fixiert und dann mit Alexa-568-markiertem Phalloidin und anti-HA-Antikörpern gefärbt. Die konfokalmikroskopische Analyse zeigte keinen signifikanten Einfluß auf die Podosomenanzahl wie auch auf die Gestalt. Allerdings war die Größe der Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich vermindert (s. Abb 3-19). α PIX- Δ GBD zeigte eine zytosolische Lokalisation, wobei auffiel, dass hier keine vermehrte ringförmige Lokalisation um Podosomen, wie bei den bisher transfizierten α PIX-Konstrukten, vorherrschte. Die statistische Auswertung der Podosomenanzahl zeigte signifikante Änderungen in den Bereichen „ <10 “ und „11-50 Podosomen pro Zelle“. Die Anzahl der 0-10 Podosomen-tragenden Makrophagen sank beträchtlich zu Gunsten derjenigen Zellen, die 11-50 Podosomen tragen. Diese Verschiebung im Niedrig-Podosomen-Bereich deutet auf einen stabilisierenden Einfluß des Konstrukts auf Podosomen hin (s. Abb 3-20 D, E).

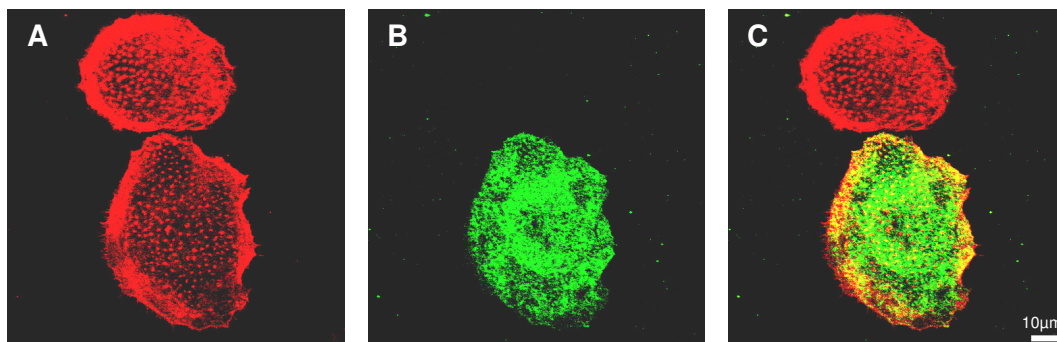


Abb. 3-19: α -PIX- Δ GBD hat keinen signifikanten Einfluß auf die Podosomen-Gestalt und -Anzahl.

Konfokalmikroskopische Aufnahme eines 7 Tage alten primären humanen Makrophagen, 4h post-transfektionem mit α PIX- Δ GBD.

(A): F-Aktin Färbung mit Alexa568-markiertem Phalloidin.

(B): anti-HA Färbung (α PIX- Δ GBD-HA), Transfektionsmarker

(C): overlay

Der Austausch zweier benachbarter Aminosäuren der DH Domäne des α -PIX-Wildtyps führte zu einem dominant negativen Genprodukt, α PIX-DN genannt, welches keine GEF Aktivität mehr besitzt (Baird et al., 2005). 7 Tage alte primäre humane Makrophagen wurden mit α -PIX-DN transfiziert, nach 4h, 8h und 24h fixiert und nach F-Aktin Färbung mit Alexa-568-markiertem Phalloidin unter dem Konfokalmikroskop analysiert.

Im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit GFP-Leervektor transfiziert waren, zeigten die α -PIX-DN exprimierenden Zellen nahezu keine morphologischen Unterschiede. Die Zellgröße war im Gegensatz zu allen anderen überexprimierten α -PIX-Konstrukten (auch des Wildtyps) im Normbereich und auch hinsichtlich Podosomenbildung und –anzahl zeigten sich keinerlei Unterschiede. Neben der zytosolischen Lokalisation, imponiert auch bei diesem Konstrukt eine ringförmige Verteilung um die F-aktin-reichen Podosomenkerne (s. Abb. 3-20). Folglich benötigt α PIX zur Lokalisation an Podosomen keine GEF-Aktivität, die beobachteten Effekte auf die Podosomen sind jedoch sehr wohl abhängig von einer funktionellen DH Domäne und damit von der GEF Aktivität.

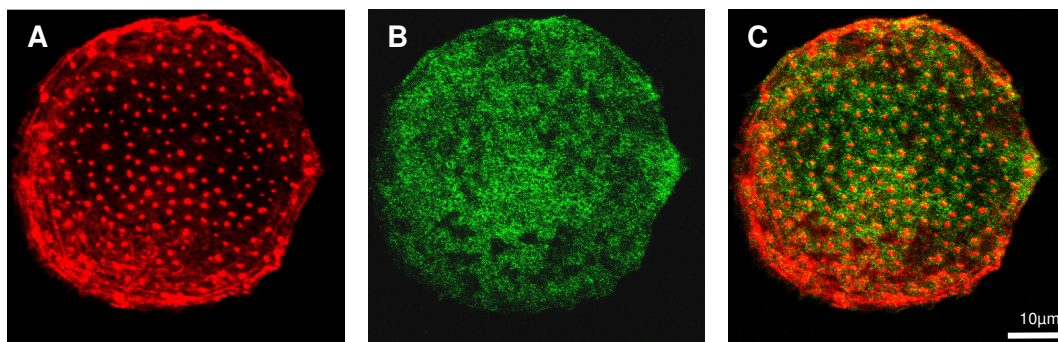
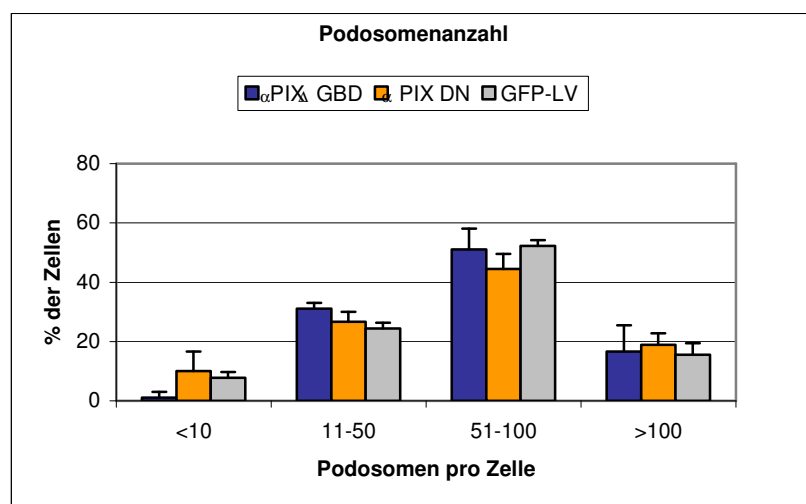


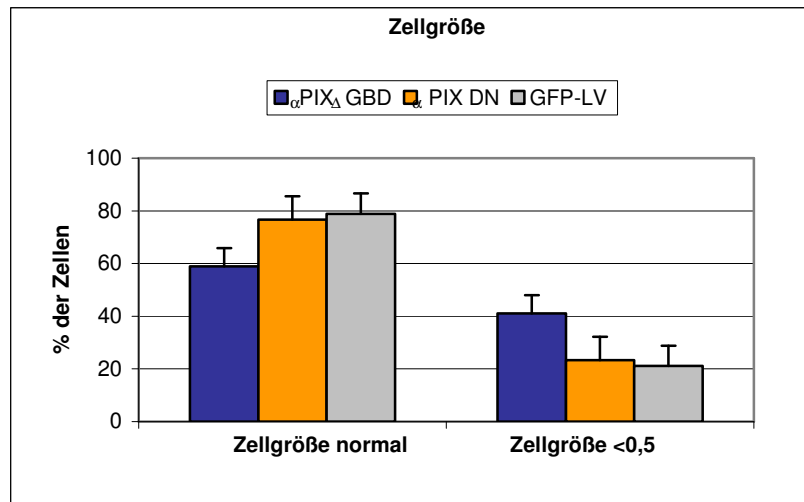
Abb. 3-20: α -PIX-DN zeigt eine ringförmige Lokalisation um Podosomen, hat aber keinen Einfluß auf die Podosomen-Bildung.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen 7 Tage alter Makrophagen transfiziert mit α PIX-DN-GFP (B), Aktinfärbung mit Alexa-568 Phalloidin (A), overlay (C). Statistische Auswertung (D,E)

D



E



Diese Daten belegen, dass α -PIX deutliche Effekte auf die Podosomenbildung in primären humanen Makrophagen hat. Das Protein weist eine peripodosomale Lokalisation auf, welche sich v.a. als Ringe um Podosomenkerne darstellt. Für diese Lokalisation scheint die GBD Domäne des α -PIX-Proteins von zentraler Bedeutung zu sein. Allein die Überexpression des α -PIX-Wildtyps zeigt deutliche zelluläre Effekte. So sind über 80% der transfizierten Zellen weniger als halb so groß wie die Kontrollzellen und weisen in 70% der Fälle Podosomen-Aggregate auf, wohingegen die Podosomenanzahl nahezu unbeeinflusst bleibt. α -PIX- Δ SH3, eine Deletionsmutante, die nicht mehr mit PAK interagieren kann, beeinflusst primäre humane Makrophagen auf ähnliche Art und Weise wie bereits beim α -PIX-Wildtyp beschrieben. Das weist darauf hin, dass die α -PIX Effekte auf die Zellen und Podosomen nicht abhängig von einer intakten SH3 Domäne sind und damit auch nicht auf die direkte Interaktion mit PAK zurückzuführen sind. Ein markanter Effekt auf die Podosomenanzahl wird durch α -PIX- Δ GBD ausgeübt: Möglicherweise kommt es hier zu einem Podosomen-stabilisierenden Effekt. Die Reduktion der Zellgröße ist bei diesem Konstrukt, im Vergleich zum Wildtyp, weniger stark ausgeprägt. Die Überexpression des dominant negativen α -PIX Konstrukts zeigt weder eine zelluläre, noch eine podosomale Wirkung. Einen Überblick hierüber liefert auch Tabelle 3-3.

Tabelle 3-3: Effekte der α -PIX-Konstrukte

Konstrukt	Beschreibung	Effekt
α -PIX-GFP	α -PIX Wildtyp	Verminderte Zellgröße, Podosomen-Cluster
α -PIX- Δ SH3	Ohne PAK Bindedomäne	Verminderte Zellgröße, Podosomen-Cluster
α -PIX- Δ GBD	Ohne GIT1 Bindedomäne	Zellgröße leicht vermindert, Podosomen-stabilisierung

α -PIX-DN	Keine GEF Aktivität, dominant negativ	Kein Effekt
------------------	--	-------------

3.5 GIT1

Den GIT (*G-protein coupled receptor kinase interacting protein target*) Proteinen werden mehrere Funktionen zugeschrieben. Allen voran dienen sie als Anker oder sog. *scaffold* (Gerüst-) Proteine, die mehrere Komponenten eines Signalweges vereinen, der beispielsweise die zytoskelettale Organisation und Adhäsion kontrolliert. So stellt GIT1 die Grundlage für den Proteinkomplex bestehend aus GIT1, Paxillin und PIX dar, der PAK an fokale Adhäsionen des *leading edge* lokalisiert (Übersicht bei Rosenberger et al., 2006). Die Einzelkomponenten des Komplexes können dann vor Ort zur Regulation des Aktinzytoskeletts beitragen.

Die Western Blot Analyse von Makrophagen-Lysaten zeigte, dass GIT1 als Polypeptid entsprechender Größe in primären humanen Makrophagen exprimiert wird (s. Abb 3-21 D). Zur Untersuchung der genauen subzellulären Lokalisation von GIT1 wurden primäre humane Makrophagen mit einem anti-GIT1-Antikörper gefärbt. Es folgte die Fixierung und Co-Färbung der F-Aktin-reichen Podosomenkerne mit Alexa-568-markiertem Phalloidin. Die konfokalmikroskopische Analyse zeigte eine GIT1 Verteilung mit vorwiegender Lokalisation peri-podosomal und in der Zellperipherie. Hierbei fällt auf, dass die Lokalisation von GIT1, ähnlich wie die von α -PIX, als ringförmig um Podosomen imponiert (s. Abb 3-21 A-C).

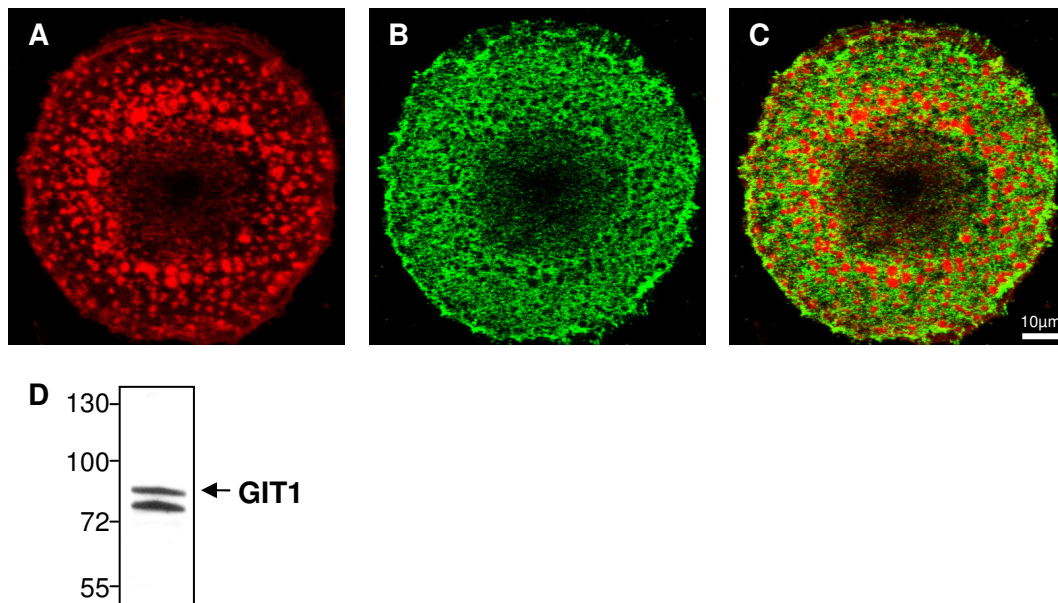


Abb. 3-21: GIT1 Lokalisation und Expression in primären humanen Makrophagen

- (A-C):** konfokalmikroskopische Aufnahme 7 Tage alter Makrophagen. (Aktinfärbung mit Alexa-568-markiertem Phalloidin (A), anti-GIT1 Antikörper (B), overlay (C)).
- (D):** Western Blot; Detektion von GIT1 (84 kDa) im Lysat primärer humaner Makrophagen

3.6 PAK4- α PIX Interaktionsstudien

PAK, PIX und GIT1 als Proteinkomplex, tragen zur Regulation der Podosomen in Fokalen Adhäsionen bei (Premont et al., 2004; Stofega et al., 2004; Turner et al., 1999). Es bestehen derzeit mehrere Hinweise, dass die Komponenten dieses Multiproteinkomplexes auch funktionell eng miteinander assoziiert sind (Webb et al., 2005; Loo et al., 2004).

Die Lokalisation aller drei Proteine am podosomal Kompartiment weist auf eine enge Verbindung von PAK, PIX und GIT1 auch in primären humanen Makrophagen hin. So lokalisiert PAK4 im podosomal Kern- und Ring-Bereich, α -PIX im Podosomen-Ring und selten auch im Podosomen-Kern und GIT1 an der podosomal Ringstruktur, aber nicht im Kern (s. Abb 3-22).

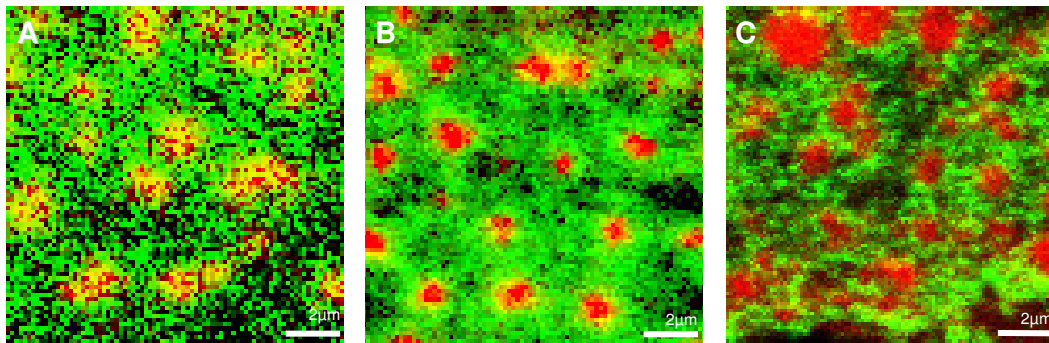


Abb. 3-22: Vergleich von PAK4, α -PIX und GIT1 bezüglich der Lokalisation an Podosomen.

7 Tage alte Makrophagen gefärbt mit Alexa-568-Phalloidin (rot) und Antikörper gegen das jeweilige Protein (grün). Dargestellt ist jeweils der overlay.

- (A): PAK4: peri-podosomale Lokalisation
 (B): α -PIX: Lokalisation im Podosomen-Ring
 (C): GIT1: Lokalisation im Podosomen-Ring, niemals im Podosomen-Kern

Weitere Hinweise zur Assoziation von PAK4 an Podosomen lieferte die Differentielle Lyse (s. Abb 3-4). Durch zusätzliche Differentielle Lyse Experimente konnte auch α -PIX in der podosomalen Zellfraktion nachgewiesen werden (s. Abb. 3-23).

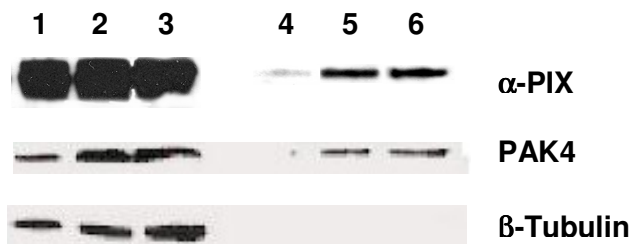


Abb. 3-23: α -PIX und PAK4 sind in der podosomalen Zellfraktion nachweisbar.

Western Blot der Differentiellen Lyse 7 Tage alter primärer humaner Makrophagen. Detektion mit anti-PIX-Antikörper, anti-PAK4-Antikörper und anti- β -Tubulin-Antikörper (Kontrolle).

Makrophagen-Lysate jeweils mit ansteigender Konzentration: 1 und 4: einfach; 2 und 5: doppelt; 3 und 6: vierfach

- 1-3: Zytoplasmatische Fraktion
 4-6: Podosomale Fraktion

Durch Immunpräzipitation wurde versucht die PAK4- α -PIX Interaktion auch auf biochemischer Ebene nachzuweisen. Bei dieser Methode werden die Proteine aus einem Zelllysate mittels spezifischen Antikörpern durch Präzipitation angereichert. Die Analyse des Präzipitats erfolgt im anschließenden Western Blot. Um zusätzlich Interaktionspartner, die an das präzipitierte Protein binden nachzuweisen, wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt und im Western Blot detektiert.

Mit der (Co-) Immunpräzipitation können jeweils das endogene Protein oder überexprimierte Proteine nachgewiesen werden. Physiologisch relevant ist jedoch der Nachweis des endogenen Proteins in unbehandelten Zellen.

Die Versuchsdurchführung erwies sich als sehr schwierig. In Vorversuchen wurden die optimalen IP-Bedingungen für jedes Protein ermittelt. Ein Problem stellte hier die zu geringe Expression des endogenen Proteins in primären humanen Makrophagen dar. Um dem zu begegnen wurden zunächst Massenansätze mit primären humanen Makrophagen konzipiert. Da diese Methode aber aufgrund der limitierten Zellanzahl nicht durchführbar war, wurde nach einem alternativen Zellsystem gesucht. HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) zeigten sich als optimales Zellsystem zur Austestung der IP-Bedingungen, da sie leicht kultivierbar sind und auch Podosomen bilden können (Osiak et al., 2005).

Die endgültigen Pufferzusammensetzungen sind unter Punkt 2.3.3.4 zusammengefasst. Besondere Beachtung muß hier den sich unterscheidenden Salzkonzentrationen für PAK4 und α -PIX geschenkt werden, die bei der Co-IP noch eine Rolle spielen werden.

Mit den für jedes Protein individuell ausgetesteten IP-Bedingungen konnten α -PIX, PAK4 und GIT1 präzipitiert und anschließend detektiert werden (s. Abb. 3-24 grüne Markierung).

Der Nachweis der Interaktion von PAK4 und α -PIX sollte nun mittels einer Cross-IP erbracht werden. Hier wird eine Co-IP mit Antikörpern gegen das jeweils andere Protein durchgeführt. Dies gestaltete sich deutlich schwieriger als die Präzipitation eines einzelnen Proteins. Zum einen unterschieden sich die Puffersalzkonzentrationen deutlich, zum anderen war auch hier die Expression der Proteine sehr gering. Um die erforderliche Proteinmenge für die Austestung der optimalen Cross-IP Bedingungen bereitzustellen, wurde hier zunächst auch auf HUVEC umgestellt. Hiermit gelang schließlich nach vielen Versuchen der Nachweis der Interaktion von PAK4 mit PIX und umgekehrt (s. Abb. 3-24A, B). In primären humanen Makrophagen konnte der Interaktionsnachweis auch mit optimalen Pufferbedingungen aufgrund der zu niedrigen Proteinmenge nicht erbracht werden. Weitere Lösungsansätze, wie z.B. die Überexpression eines Proteins (z.B. GFP-PAK4) und Cross-IP des Interaktionspartners (z. B. α -PIX), Massenansätze oder der sog. *preclear* (Verminderung der Bindung unspezifischer Proteine) wurden getestet und waren nicht erfolgreich.

Die Interaktion von α -PIX und GIT1 hingegen konnte sowohl in HUVEC als auch in primären humanen Makrophagen gezeigt werden. Es erfolgte jedoch keine Präzipitation von PAK4 mit GIT1 (s. Abb. 3-24C, D).

Die Zusammensetzungen der letztendlich verwendeten IP und Co-IP Puffer finden sich unter 2.3.3.4.

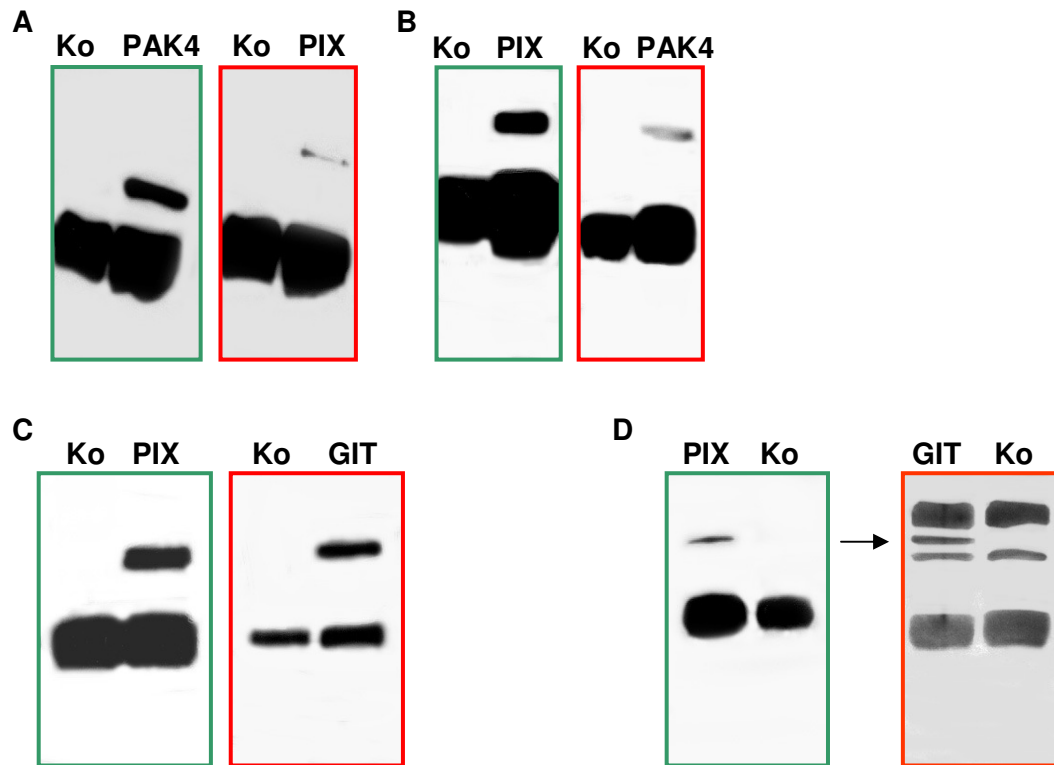


Abb. 3-24: Interaktionsstudien PAK4- α -PIX und α -PIX-GIT1 in HUVEC und Makrophagen.

(A-C) HUVEC-Lysate wurden mit entsprechendem Antikörper inkubiert, präzipitiert und mittels Western Blot analysiert. Als Kontrolle diente jeweils IgG der selben Spezies wie der Antikörper. Für Co-IPs erfolgte die zusätzliche Detektion des Interaktionspartners im Western Blot mit spezifischen Antikörpern. Farbliche Markierung: IP in grün, Co-IP in rot.

(A): PAK4-IP; Co-IP von PIX

(B): PIX-IP; Co-IP von PAK4

(C): PIX-IP; Co-IP von GIT

(D): PIX-IP; Co-IP von GIT in primären humanen Makrophagen.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Mikroskopie- und der Differentielle Lyse-Experimente zeigen, dass PAK4 und α PIX in der podosomalen Fraktion primärer humaner Makrophagen angereichert sind.

Weiter konnte durch (Co-) Immunpräzipitation bestätigt werden, dass PAK4, α PIX und GIT1 in primären humanen Makrophagen-Lysaten nachzuweisen und auch eng miteinander assoziiert sind. Eine direkte Interaktion der Proteine untereinander konnte aufgrund der zu geringen Proteinmengen in Makrophagen jedoch nur für PIX und GIT1 erbracht werden.

In HUVEC (*human umbilical endothelial vein cells*), die auch im Stande sind podosomale Strukturen zu bilden, konnte die direkte Interaktion aller drei Proteine nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Vorbemerkung

Podosomen sind hochdynamische Adhäsionsstrukturen, die typischerweise in monozytären Zellen, aber auch in transformierten Fibroblasten, Endothelzellen und in glatten Muskelzellen gefunden werden. Die Adhäsion von Krebszellen wird u.a. durch Invadopodien vermittelt, die wahrscheinlich mit Podosomen verwandt sind (Linder, 2007). Die Ausbildung von Podosomen kann von äußeren Reizen wie z.B. bakteriellen Substanzen oder endogenen Chemokinen getriggert werden und stellt wahrscheinlich eine funktionelle Anpassung der migrierenden Zelle auf verschiedene Reize dar (Poincloux et al., 2006; Linder et al., 2003; Osiak et al., 2005). Die Tatsache, dass Podosomen einerseits an der physiologischen Matrixdegradation migratorischer Makrophagen beteiligt sind, andererseits aber auch in invasiv grenzüberschreitend wachsenden Krebszellen zu finden sind, lässt die genauere Betrachtung der Regulation interessant erscheinen. Die hohe podosomale Dynamik, sichtbar durch eine Halbwertszeit von 2-12 Minuten und eine noch höhere interne F-Aktin-Dynamik weisen auf einen feinregulierten Mechanismus in gesunden, nicht entarteten Zellen hin (Destaing et al., 2003). In Krebszellen, so wird angenommen, liegt eine dysregulierte Podosomen-/Invadopodienbildung vor.

Drei neuartige Proteine dieser Podosomen-regulatorischen Signalwege - Cofilin, PAK4 und α -PIX - werden in dieser Arbeit speziell in primären humanen Makrophagen untersucht und die gewonnenen Erkenntnisse präsentiert.

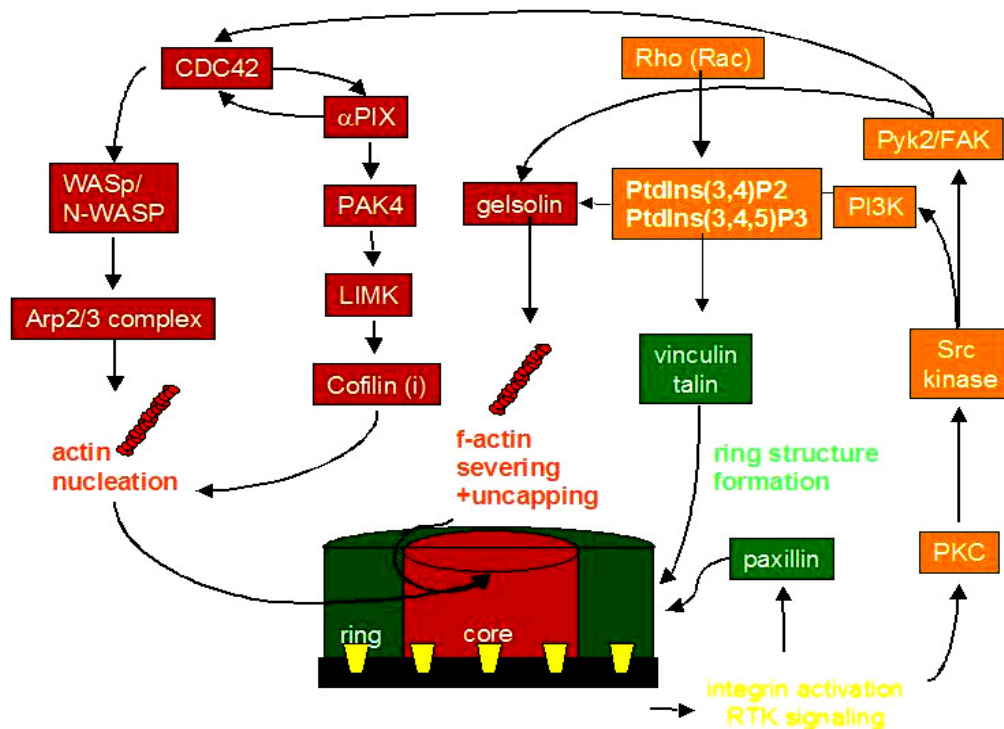


Abb. 4-1: aktinregulatorische Signalwege

Schematische Darstellung bekannter Signalkaskaden der Podosomen-Regulation. Regulatoren des F-aktin-reichen Kerns (rot), der Ringstruktur in grün und übergeordnete Proteine in orange. (Modifiziert nach Linder und Kopp, 2005)

4.1 Bedeutung von Cofilin für die Podosomen-Regulation

Es ist bekannt, dass Cofilin als Aktin-depolymerisierendes Protein u.a. wichtig für die Entstehung von voll funktionstüchtigen Invadopodien ist (Condeelis et al., 2006). Wie strukturelle und funktionelle Analysen zeigten, sind Invadopodien und Podosomen in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich (Linder et al., 2007). Daher könnte Cofilin auch in primären humanen Makrophagen hinsichtlich der podosomal Aktin-Regulation von großer Wichtigkeit sein.

Cofilin beeinflusst den Aktin-Filament-*turnover* über zwei Mechanismen: einerseits erhöht es die Aktin-Depolymerisationsrate am *pointed end* und sorgt damit für den erforderlichen Aktinmonomer-Nachschub für das Wachstum am *leading edge*. Andererseits werden durch die *severing*-Funktion neue *barbed ends* geschaffen, die verlängert werden können (Maciver et al., 1998, Condeelis, et al., 2001).

Wie bereits erwähnt, bestehen die Aufgaben von Cofilin in der Regulation des Aktinzytoskeletts. So kann es als Aktin-modulierendes Protein F-Aktin binden und depolymerisieren. Von zentraler Bedeutung hierfür ist v.a. die Aminosäure Ser-3, durch welche einerseits die Aktivität des Proteins reguliert wird (Phosphorylierung von Ser-3 führt zur Inaktivierung des Proteins), welche aber auch für die Bindung an das

Aktinfilament und damit für die lokale Steuerung der Cofilin-Wirkung wichtig ist (Bamburg et al., 1999) (s. Abb. 4-2).

Über die genaue zelluläre Lokalisation von Cofilin lässt sich derzeit keine einheitliche Aussage treffen. Eine Anreicherung an Orten hohen Aktin-Umsatzes, z.B. Podosomen in Makrophagen, wird in dieser Arbeit beschrieben. Weiter zeigt sich Cofilin in migrierenden Zellen als aktive Form gebunden an das Aktinfilament, in ruhenden Zellen hingegen ist es phosphoryliert und inaktiv im Zytoplasma lokalisiert (Moriyama et al., 1996; Okada et al., 1996; Yonezawa et al., 1987; Chhabra et al., 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Cofilin für die Podosomen-Regulation in primären humanen Makrophagen untersucht. Hierzu wurden die Lokalisation und die Auswirkungen der Überexpression bestimmter Cofilin-Mutanten evaluiert. Wie eingangs erwähnt, ist die Aminosäure Ser-3 für die Funktionalität und die zelluläre Lokalisation des Cofilin-Moleküls von zentraler Bedeutung. Deshalb wurden in dieser Arbeit Wildtyp-Cofilin, eine konstitutiv aktive Mutante (S3A) und eine mutierte Version, die nicht mehr an Aktin binden kann (S3D), hinsichtlich der subzellulären Lokalisation sowie ihrer Funktion in primären humanen Makrophagen untersucht (s. Abb. 4-2).

Wildtyp-Cofilin zeigt eine Lokalisation um die aktinreichen Podosomenkerne und z.T. auch eine partielle Co-Lokalisation mit Podosomenkernen, wohingegen konstitutiv aktives Cofilin (S3A) zwar an Aktin-reichen Zellstrukturen zu finden ist, jedoch keine Wildtyp-typische Lokalisation speziell um Podosomen zeigt (s. Abb. 3-1).

Die Überexpression des Cofilin-Wildtyps zeigt keine nennenswerten Einflüsse auf den Podosomengestalt, -anzahl und -lokalisation. Offensichtlich können die zellulären Mechanismen das Cofilin-Überangebot gut bewältigen, so dass das fein regulierte Gleichgewicht zwischen Aktinauf- und abbau, beurteilt anhand des Podosomen-Phänotyps, nur marginal beeinträchtigt wird. Über die interne Aktindynamik ist jedoch mit diesem Versuchsansatz keine Aussage möglich. Hierzu könnten weitere Versuche mit der FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*)-Technologie weiterhelfen.

Bei Analyse der konstitutiv aktiven Mutante (S3A) fiel auf, dass die Zellen die Auslenkung des fein regulierten Aktin-Gleichgewichts nicht mehr kompensieren konnten, was sich durch einen deutlich negativeren Effekt auf die Podosomenbildung bemerkbar machte: durch zuviel aktives Cofilin wurde das Gleichgewicht in Richtung Aktinabbau verschoben. Dies führte zunächst zu einem verminderten podosomal F-Aktinegehalt, später ganz zum Verschwinden der Podosomen. Nach 24h hatten sich fast alle S3A überexprimierenden Zellen vom *coverslip* abgelöst, was zusätzlich auf eine bedeutende Rolle von Cofilin, nicht nur hinsichtlich der Regulation der Adhäsions-vermittelnden

Podosomen, sondern auch des gesamten Aktin-Zytoskeletts in primären humanen Makrophagen hinweist.

Ähnliches wurde 1996 von Moriyama et al. in Hefezellen beobachtet. Hier führte sowohl die Überexpression von Wildtyp-Cofilin, als auch von konstitutiv aktivem Cofilin (S3A) zur Auflösung bereits bestehender Aktinstrukturen und zur Bildung von zytoplasmatischen Aktinbündeln. Das kann zumindest für das S3A-Konstrukt auch in primären humanen Makrophagen bestätigt werden. Die Diskrepanz bezüglich der Cofilin-Wildtyp Wirkung in humanen Makrophagen verglichen mit der Hefe lässt sich eventuell auf Spezies-spezifische Eigenheiten zurückführen.

Das Cofilin-Konstrukt, welches nicht mehr an F-Aktin binden kann (S3D), zeigt in primären humanen Makrophagen eine diffuse Verteilung im Zytoplasma ohne Co-Lokalisations-Tendenz an aktinreiche Zellstrukturen. Die Podosomenbildung war erst nach 24h beeinträchtigt: nur noch 20% der Zellen zeigten Podosomen. Möglicherweise wirkt S3D-Cofilin als kompetitiver Inhibitor des endogenen Cofilins. Dadurch werden Interaktionspartner gebunden, die nicht mehr der Regulationskaskade zur Verfügung stehen, was sich in einer fehlregulierten Podosomenbildung widerspiegelt. Zu früheren Zeitpunkten zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zum Cofilin-Wildtyp. Auffällig war das vermehrte Auftreten irregulär geformter Zellen.

Moriyama et al. beobachtete, dass S3D-Cofilin Aktinstrukturen in Hefezellen nicht beeinflusst. Dies konnte für primäre humane Makrophagen nicht bestätigt werden (s.o.). Für den Zuwachs an irregulär geformten Zellen könnte eine vermehrte Dysregulation des Aktinzytoskeletts durch die Beeinträchtigung der lokalen Cofilinwirkung am Aktinfilament ursächlich sein. Da die Reduktion der podosomalen Strukturen erst nach 24h nachweisbar ist, ist davon auszugehen, dass bis dahin der noch vorhandene zelluläre Cofilinpool für die Aktinregulation ausreichte.

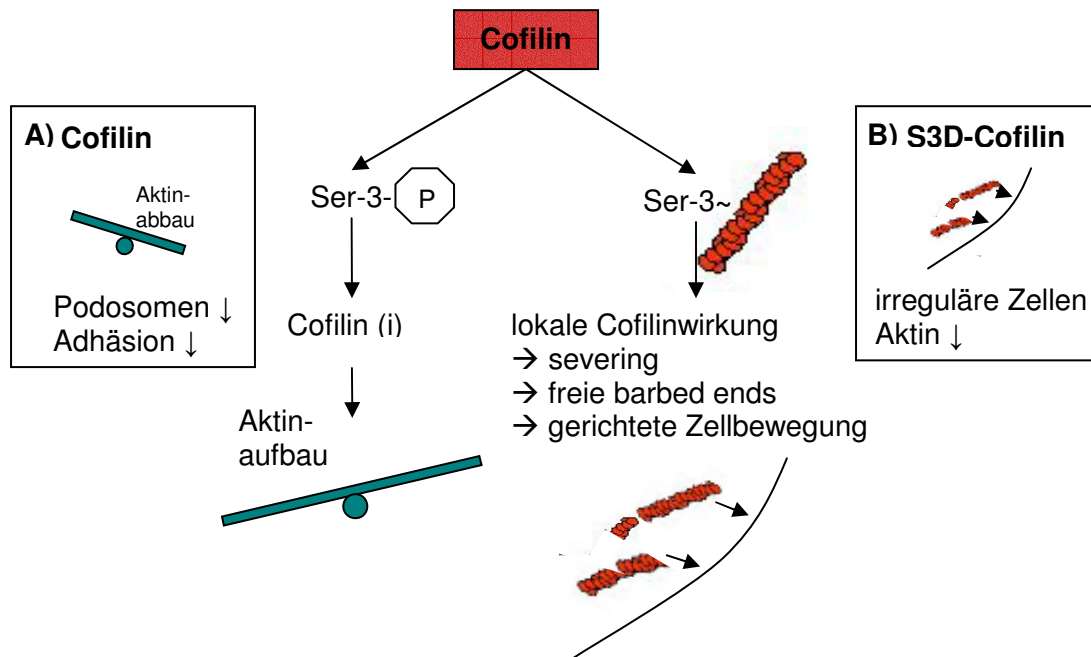


Abb. 4-2: Cofilinwirkung in primären humanen Makrophagen

Ser-3 übernimmt die zentrale Regulation im Cofilin-Molekül: einerseits die Regulation des Aktivitätszustandes, andererseits die Bindung an F-Aktin. Die Phosphorylierung von Ser-3 führt zu einer Inaktivierung von Cofilin (Cofilin (i)).

- (A) S3A-Cofilin (konstitutiv aktiv) führt zu vermehrtem Aktin- und Podosomenabbau
- (B) S3D-Cofilin (keine Aktinbindung) kann keine lokale Aktinregulation mehr vermitteln, was eine irreguläre Zellform und Aktindysregulation zu Folge hat.

4.2 Bedeutung von PAK4 für die Podosomen-Bildung

RhoGTPasen beeinflussen das Zytoskelett als zelluläre Schalter in vielerlei Hinsicht (Hall et al., 1998). So spielen die RhoGTPasen CDC42, Rac1 und RhoA auch bei der Regulation von Podosomen eine entscheidende Rolle (Linder et al., 1999; Ory et al., 2000; Burns et al., 2001). Über die entsprechenden *downstream* Effektoren, die an der Podosomen-Regulation beteiligt sind, ist jedoch weniger bekannt. Diese Arbeit konzentriert sich hier besonders auf die durch Rac1 und CDC42 vermittelte Phosphorylierung und damit Deaktivierung von Cofilin, welche über die Aktivierung von LIM-Kinasen durch die RhoGTPase Effektoren *p21-activated kinases* (PAKs) vermittelt werden kann (Edwards et al., 1999; Dan et al., 2001).

Es ist bekannt, dass die Überexpression von PAK1 Kinase-Mutanten zur Podosomen-Bildung in glatten Muskelzellen führt. Hierbei scheint die Interaktion von PAK1 mit β -PIX wichtig für die Lokalisation an die podosomale Ringstruktur zu sein (Webb et al., 2005). Bisher war jedoch nicht bekannt, welche der sechs bekannten PAK-Isoformen physiologische Podosomen-Regulatoren in primären humanen Makrophagen sind. Um

eine Podosomen-spezifische Isoform in primären humanen Makrophagen identifizieren zu können, wurden in dieser Arbeit verschiedene Ansatzpunkte verfolgt.

Die Podosomenbildung ist vom Substratkontakt abhängig (Übersicht bei: Linder and Kopp, 2005). So fehlen sie z.B. in nicht-adhärenenten Monozyten, wohingegen sie als prominente Aktin-Zytoskelettstrukturen in differenzierten, adhärenenten Makrophagen vorliegen. Da Podosomen nur in adhärenenten Makrophagen ausgebildet werden, wurde in dieser Arbeit die Proteinexpression der an der Podosomenbildung beteiligten Aktin-Regulatoren im Vergleich zu nicht-adhärenenten Monozyten genauer untersucht. Hierfür eignet sich die Analyse der mRNA Level von PAK1 und PAK4, als prominente Vertreter der beiden Untergruppen, mit der *micro array* Technologie (Davison et al., 2006; Hofman et al., 2005). Es zeigte sich eine vierfache Erniedrigung der PAK1 mRNA Levels in Makrophagen, die mRNA Level für PAK4 blieben unverändert. Dies deutet darauf hin, dass PAK1 wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle während der Differenzierung vom Monozyten in einen gewebeständigen Makrophagen spielt und dass v.a. eine erhöhte PAK4-gesteuerte Signaltransduktion bei der Ausbildung des adhärenenten Phänotyps beteiligt ist. Allerdings können mit dieser Methode nur Aussagen über signifikant unterschiedliche relative mRNA Level von adhärenenten und nicht-adhärenenten Zellen gemacht werden. Diese Methode liefert keine Aussagen über die Funktionalität, Stabilität oder Expression der Proteine und muss daher durch weitere Versuche ergänzt werden.

Einen weiteren Anhaltspunkt für PAK4 als physiologischen Podosomen-Regulator in primären humanen Makrophagen lieferten Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen PAK1 bzw. PAK4. Es konnte bei größtenteils zytosolischer Verteilung eine partielle Co-Lokalisation von PAK4 mit Podosomen nachgewiesen werden, wohingegen PAK1 nicht mit diesen Strukturen assoziiert war und lediglich Anreicherung in der Zellperipherie zeigte.

Mit Hilfe der Differentiellen Lyse konnte das podosomale Zellkompartiment getrennt von den restlichen Zellbestandteilen untersucht werden. Auch hier zeigte sich eine Anreicherung von PAK4, und nicht von PAK1, in der adhäsionsvermittelnden Podosomen-reichen Zellfraktion. Hiermit konnte zusammen mit den beiden anderen Ansätzen untermauert werden, dass sehr wahrscheinlich PAK4 ein physiologischer Regulator von Podosomen in primären humanen Makrophagen ist.

Diese Ergebnisse sind z.T. gut mit den bisherigen, in der Literatur beschriebenen Beobachtungen vereinbar. Hinsichtlich der organspezifischen Expression beider PAK-Isoformen ist folgendes bekannt: PAK4 wird v.a. im menschlichen Colon, Testis und Prostata, aber auch ubiquitär exprimiert, wohingegen PAK1 nur im Muskel, Milz und Gehirn zu finden ist. So konnte von Webb et al., 2005 gezeigt werden, dass PAK1 in

glatten Muskelzellen an Podosomen lokalisiert. Für die Beuteilung der subzellulären Lokalisation der PAK-Isoformen muß der Aktivitätszustand der Zelle miteinbezogen werden. So ist PAK1 in ruhenden Fibroblasten zytosolisch, nach Aktivierung der Zellen fast vollständig an Orten der Zellprotrusion (*ruffles* und Lamellipodien) lokalisiert (Dharmawardhane et al., 1997; Parrini et al., 2005). PAK4 ist in ruhenden Endothelzellen auch zytosolisch, jedoch besonders in der perinukleären Region zu finden. Durch Rac-Aktivierung wird nur ein kleiner Teil an Lamellipodien transloziert. Nach Stimulation durch CDC42 kommt es nahezu vollständig zur Translokation an das trans-Golgi-Netzwerk um von dort aus verteilt zu werden (Abo et al., 1998; Callow et al., 2002).

Hinweise für funktionelle Hintergründe der spezifischen Expression und Lokalisation von PAK4 in primären humanen Makrophagen können durch Analyse der Rho-GTPase vermittelten Zytoskelettveränderungen gewonnen werden. Es ist bekannt, dass PAK1 Expression zwar zu Änderungen der Zellmorphologie führt, jedoch konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass es nicht direkt für alle CDC42 bzw. Rac vermittelten Zytoskelettveränderungen benötigt wird (Manser et al., 1997; Sells et al., 1997). PAK4 hingegen als der vorrangige Mediator von CDC42-induzierter Aktinreorganisation wird stark exprimiert.

Die Adhäsions- und Diapedesefähigkeit der Makrophagen macht sehr häufig markante und schnelle Veränderungen des Zytoskeletts notwendig. Da PAK1 im Vergleich zu PAK4 eine etwas unbedeutendere Stellung in der adhäsionsvermittelnden Signalkaskade einnimmt, wird es womöglich auch weniger stark in diesen Zellen/Kompartiment exprimiert. Untermauert wird diese These durch *gene array* Daten, die zeigen, dass das PAK1 mRNA Level in adhärenenten Makrophagen stark vermindert ist, wohingegen PAK4 mRNA in gleichem Maße gebildet wird. Dies ist womöglich ein Indiz dafür, dass PAK4- und nicht PAK1 in humanen Makrophagen als primärer Podosomen-Regulator fungiert. Hier liegt offenbar eine physiologisch-funktionell bedingte Anpassung der PAK-Isoenzym-Expression vor.

Zur Determinierung der funktionellen Bedeutung wurden PAK4 *knockdown* Experimente und die Auswirkungen der Expression verschiedener PAK4-Mutanten auf humane Makrophagen untersucht.

Es ist bekannt, dass PAK4-*knockout*-Mäuse nicht lebensfähig sind und bereits am 12. Embryonaltag an kardialen Mißbildungen sterben. Desweiteren weisen diese Tiere Defekte der neuronalen Differenzierung und Migration auf. Dies wird u.a. auf eine überproportional starke Ausbildung von Fokalen Adhäsionen zurückgeführt, was durch eine vermehrte Adhäsion an der extrazellulären Matrix die Migration der Neuronen behindert (Qu et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss eines weniger invasiven PAK4 *knockdowns* auf die podosomale Adhäsion primärer humaner Makrophagen untersucht, die unabdingbar für die Migrationsfähigkeit dieser Zellen ist.

Mittels RNAi-Experimenten konnte die wichtige Rolle von PAK4 für die Podosomenbildung in primären humanen Makrophagen bestätigt werden. Zunächst zeigten shPAK4-transfizierte Zellen einen markanten Podosomenverlust (60% der Zellen hatten <50 Podosomen), wobei die Zellgröße und die Adhäsion an das Substrat unbeeinflusst blieben. Zu späteren Zeitpunkten (>48h) rundeten sich die Zellen ab und lösten sich vom Untergrund. Einerseits implizieren diese Ergebnisse die Wichtigkeit einer strikten Regulierung des PAK4 Levels für eine regelhafte Podosomenbildung und der Aufrechterhaltung ihrer Funktionen. Andererseits wird auch die generelle Notwendigkeit von PAK4 für die Makrophagen-Physiologie verdeutlicht. PAK4 shRNA wurde bisher auch in einigen Krebszelllinien und HeLa Zellen exprimiert. Auch hier konnte eine bedeutende Rolle des Proteins hinsichtlich verschiedener Mechanismen, die das Zellüberleben sichern, gezeigt werden (Li et al., 2005).

Durch Überexpression von PAK4-Wildtyp und einiger PAK4-Mutations-Konstrukte wurde der Einfluss verschiedener PAK4-Subdomänen auf die Podosomenregulation untersucht. Das überexprimierte PAK4-Wildtyp-Konstrukt zeigte einerseits eine zytosolische Lokalisation, ist aber auch teilweise diffus verteilt, verbunden mit einer Konzentration um aktinreiche Strukturen. Es konnte in den meisten Fällen kein nennenswerter Einfluss auf die zelluläre bzw. podosomale Morphologie beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit früheren Veröffentlichungen, die auch keinerlei morphologische Veränderungen durch die Überexpression des PAK4-Wildtyps in verschiedenen Zellarten beschreiben (Abo et al., 1998; Dan et al., 2001; Qu et al., 2001; Wells et al., 2002). In Zusammenschau mit den bereits oben diskutierten sh-RNA Versuchen kann man schlussfolgern, dass basale PAK4-Level für eine intakte Podosomen-Bildung benötigt werden, jedoch die Überexpression die Zelle nicht beeinflusst.

Die Aktivierung der Gruppe I PAK-Isoformen (PAK1-3) wurde bisher hinreichend aufgeklärt. Hier kommt es zunächst durch die Dissoziation des PAK-Dimers zur Auflösung der inhibitorischen Proteinkonfiguration, die dann die Autophosphorylierung einiger Aminosäurereste der Kinasedomäne und damit die eigentliche Aktivierung nachsichzieht (Lei et al., 2000). Ob dieser Mechanismus auch für die Mitglieder der Gruppe II PAKs (PAK4-6) zutrifft ist derzeit unklar. Es bestehen Hinweise, dass auch bei PAK4 eine intramolekulare Inhibitionskonfiguration im Sinne einer Überlappung der Kinasedomäne durch die PBD existiert (Wells et al., 2002). Für die PAK4- Δ PBD Trunkationsmutante wurde gezeigt, dass sie durch die fehlende Überlappung der Kinasedomäne in einem

nicht inhibierten, aktiven Zustand vorliegt, aber dennoch weiter durch Autophosphorylierung der Kinasedomäne stimuliert werden kann (Wells et al., 2002). Es ist auch bekannt, dass CDC42 durch die fehlende PBD nicht mehr an PAK4 gebunden werden kann (Abo et al., 1998). In MDCK-Zellen führte die PAK4- Δ PBD Überexpression zu einem Verlust des Zell-Substrat-Kontaktes (Wells et al., 2002), HeLa-Zellen und Fibroblasten zeigten vermehrt Stressfasern und Fokale Adhäsionen (Manser et al., 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PAK4- Δ PBD-Überexpression zu einer Reduktion der Podosomenanzahl in primären humanen Makrophagen führt. Auch das Auftreten von Podosomen-Clustern kann als Zeichen einer dysregulierten Podosomenbildung gewertet werden. Die in dieser Arbeit beobachtete rein zytosolische Lokalisation des Konstrukts ohne Co-Lokalisation an aktinreiche Strukturen wurde auch bereits in Fibroblasten gefunden (Abo et al., 1998). Durch die verhinderte CDC42 Bindung an PAK4 kann dieses Protein wohlmöglich nur bedingt an aktinreiche Strukturen, wie beispielsweise Podosomen, lokalisieren.

Wie bereits auch für Endothelzellen, dendritische Zellen und Makrophagen gezeigt, spielt CDC42 hinsichtlich der Podosomenregulation in diesen Zellsystemen eine wichtige Rolle (Linder et al., 1999; Burns et al., 2001; Moreau et al., 2003). Desweiteren konnten die Ergebnisse dieser Arbeit den hohen Stellenwert dieses Signalweges, insbesondere seiner Einzelkomponenten PAK und PIX, für primäre humane Makrophagen bestätigen.

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Kinasedomäne von PAK4 wichtig für lokalisierte Aktinregulation ist (Abo et al., 1998). Desweiteren wurden bestimmte Serinreste (z.B. Ser-474) identifiziert, die für die volle Aktivierung des Proteins autophosphoryliert werden müssen. Im PAK4-K350M (PAK4-KM) Konstrukt wurde eine derartige Autophosphorylierungssequenz zerstört, was eine defekte Aktinpolymerisation in Fibroblasten zur Folge hatte (Abo et al., 1998). Andererseits zeigte eine zweifache Punktmutation, die zu einem konstitutiv aktiven PAK4-Konstrukt, PAK4-S445N/S474E (PAK4-NE) führte, eine verstärkte Kinaseaktivität (Qu et al., 2001). Dies führte in Fibroblasten zunächst zur vorübergehenden Filopodieninduktion, über längere Zeit jedoch zur Auflösung von Stressfasern und Fokalen Adhäsionen, was sich in einer verminderten Adhäsion auf extrazellulärer Matrix widerspiegelt. Gleichzeitig induzierte diese konstitutiv aktive PAK4-Mutante eine verstärkte Proliferation, was zu einem *anchorage independent growth* in Suspension führt und damit erklärt, warum die Überexpression von aktiviertem PAK4 mit der Tumorgenese assoziiert ist (Qu et al., 2001; Callow et al., 2002).

In dieser Arbeit sollte der Einfluss beider Mutationen der PAK4-Kinasedomäne auf die Podosomenbildung in primären humanen Makrophagen untersucht werden. Interessanterweise führte die Überexpression beider Konstrukte nur zu einer leichten Abnahme der Podosomenanzahl. Dagegen unterschied sich die Gestalt der

verbleibenden Podosomen deutlich: Während diese bei der Kinase-inaktiven Mutante (PAK4-KM) sehr klein und wenig leuchtintensiv (wenig F-Aktin) waren, waren sie bei PAK4-NE transfizierten Zellen im Vergleich zu normalen Podosomen deutlich größer und hatten einen erhöhten F-Aktin-Gehalt. Dies konnte durch die Messung der F-Aktin-basierten Fluoreszenz nach Phalloidin-Färbung auch statistisch bestätigt werden: Makrophagen, die mit dem Kinase-inaktiven Konstrukt transfiziert wurden zeigten eine Abnahme der F-Aktin-basierten Fluoreszenz um mehr als 50%, wohingegen die Überexpression der konstitutiv aktiven PAK4 Mutante (PAK4-NE) eine Zunahme der Fluoreszenz-Intensität um mehr als 100% zur Folge hatte. Die Expression der inaktiven Mutante (PAK4-KM) führt damit zu abnehmendem F-Aktin-Gehalt und damit zu kleineren Podosomen, während die Expression des aktiven Konstrukts (PAK4-NE) über eine Zunahme des F-Aktin-Levels die Bildung leuchtstarker, größerer Podosomen bewirkt.

Es scheint demnach, dass die Reduktion der Podosomenanzahl ein Kinase-unabhängiger Effekt ist. Die gegenteiligen Effekte der beiden PAK4-Konstrukte sind hingegen offensichtlich auf die Kinase-Aktivität zurückzuführen. Dies ist gut vereinbar mit dem Regulationsweg über LIM Kinase und Cofilin. PAK4 aktiviert durch Phosphorylierung LIM Kinase, die wiederum Cofilin inaktiviert. Dies führt über einen verminderten Aktinabbau zu einer Erhöhung des F-Aktingehalts in Podosomen. Vor diesem Hintergrund konnten bereits in PAK4-NE überexprimierenden Myoblasten vermehrt Aktin-Aggregate festgestellt werden (Dan et al., 2001).

Dem gegenüber steht die Expression einer PAK4-Trunkationsmutante (PAK4-RD), die keine Kinase-Domäne mehr enthält. Dieses Konstrukt zeigte weder eine Beeinflussung der Podosomenanzahl oder -gestalt, noch der Zellmorphologie. Dennoch zeigte dieses Konstrukt, im Gegenteil zum PAK4-Wildtyp und den beiden Kinasendeletionsmutanten (PAK4-KM und PAK4-NE), keinerlei Lokalisation an Podosomen.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die Kinasedomäne *per se* an der Lokalisation des PAK4-Proteins an Podosomen beteiligt ist und dass die Kinase-Aktivität die individuelle Podosomengröße durch Beeinflussung des F-Aktin levels im Podosomenkern reguliert. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass Podosomen in glatten Muskelzellen (A7r5) sowohl durch Kinase-aktive, als auch –inaktive PAK1-Mutanten induziert werden können. Dies zeigt, dass die PAK1-Kinase-Aktivität in diesem Zellsystem offensichtlich nicht notwendig für die Podosomenbildung ist. Jedoch scheint die PAK1-Kinaseaktivität die Dynamik der induzierten Podosomen zu beeinflussen (Webb et al., 2005).

Eine weitere Doppel-Trunkationsmutante, PAK4- Δ KD- Δ GBD ohne CDC42-Bindungs- und Kinasedomäne stand zur Verfügung. Trotz vielfacher Bemühungen, die Expressionsbedingungen zu optimieren, gelang es nicht dieses Konstrukt zu exprimieren.

Offensichtlich haben diese Deletionen einen derart gravierenden Einfluss auf die Zellphysiologie, der das Zellüberleben unmöglich macht.

Eine kurze Zusammenfassung der in dieser Arbeit evaluierten Konstrukte findet sich in Abb. 4-3.

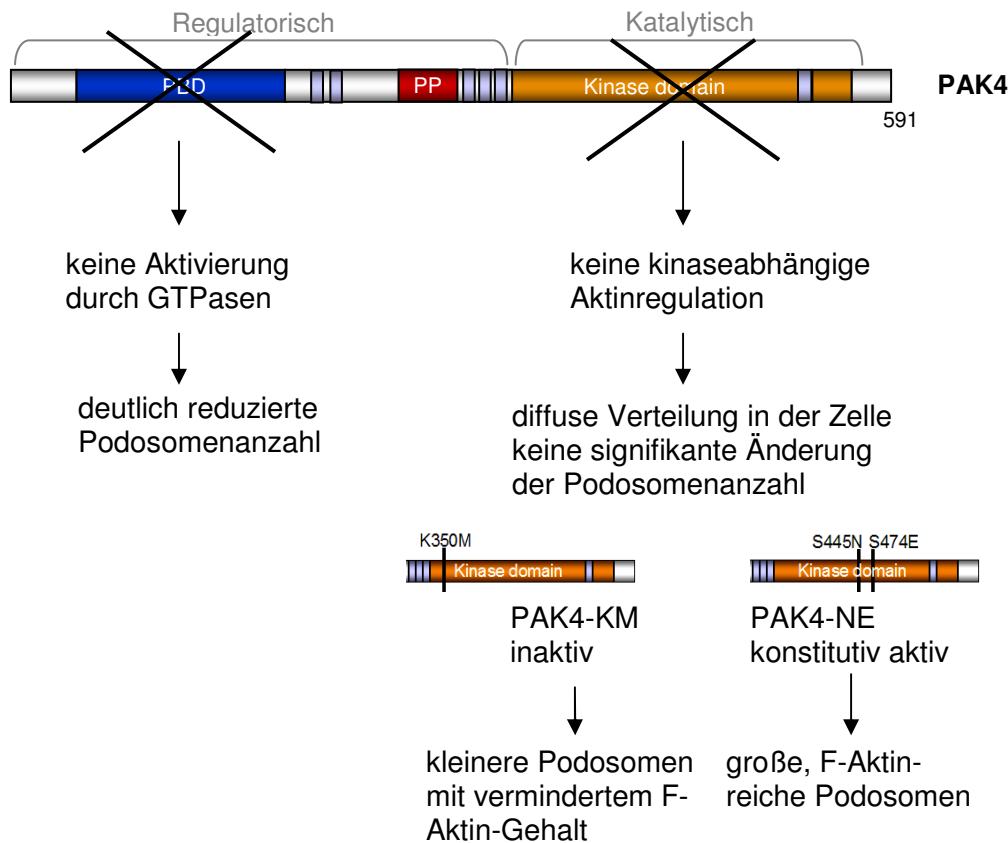


Abb. 4-3: Übersicht Effekte der PAK4-Konstrukte.

4.3 Bedeutung von α -PIX für die Podosomen-Bildung

PIX ist als PAK-bindendes Protein maßgeblich an der Translokation von PAK an Fokale Adhäsionen und an der PAK Aktivierung beteiligt. Hierbei zeigen die verschiedenen PIX-Isoformen unterschiedliche Funktionen hinsichtlich der PAK Aktivierung. In dieser Arbeit wurde der Einfluß von α -PIX auf die Podosomenbildung näher untersucht, das in mehreren Studien eine starke PAK-Aktivierung in Cos-1 Zellen zeigte. (Bagrodia et al., 1999; Daniels et al., 1999; Feng et al., 2002).

Der genaue Mechanismus bzw. der Stellenwert von α -PIX hinsichtlich der CDC42 vermittelten Podosomenregulation ist noch nicht endgültig geklärt. Es wird jedoch eine duale Rolle von α -PIX angenommen. Zum einen kann α -PIX die PAK4-Aktivität stark stimulieren, andererseits fungiert α -PIX sowohl als GEF (*guanine nucleotide exchange*

factor) und damit Aktivator, als auch als *downstream* Effektor von CDC42 (Feng et al., 2004; Baird et al., 2005; Webb et al., 2005).

Mittels Immunfluoreszenzfärbung und Transfektion konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass α -PIX in Ringen um den Aktin-reichen Podosomenkern lokalisiert ist. Durch eine weitere Co-Färbung mit Paxillin, einem Protein der Podosomenringstruktur, konnte eine Co-Lokalisation mit Paxillin belegt werden. Dies ist gut vereinbar mit der These, dass der α -PIX-enthaltenden Proteinkomplex die Funktion innehat, PAK1 über Paxillin an Fokale Adhäsionen zu translozieren (Webb et al., 2005), damit es vor Ort Aktin-Reorganisation regulieren kann.

Die Überexpression des α -PIX-Wildtyp Konstruktes zeigte neben der Assoziation an die Podosomen-Ringstruktur deutliche zelluläre und podosomale Effekte. So sind über 80% der transfizierten Zellen im Durchmesser weniger als halb so groß wie die Kontrollzellen und weisen in 70% der Fälle Podosomen-Aggregate auf, wohingegen die Podosomen-Anzahl nahezu unbeeinflusst bleibt. Dies deutet darauf hin, dass die vermehrte Expression von α -PIX nicht kompensiert werden kann und somit eine Aktivierung der Aktinpolymerisation wahrscheinlich vermittelt über die Aktivierung von CDC42 und PAK4 zur Folge hat. Hier scheint die direkte Aktivierung von PAK4 wahrscheinlicher, da CDC42 PAK4 nur bedingt aktiviert (Abo et al., 1998). Die verminderte Zellgröße ist möglicherweise auf die vom Konstrukt ausgehende Toxizität zurückzuführen, die ein Verkrampfen der Zelle auslöst. Dennoch scheinen die Adhäsionsstrukturen davon nur wenig beeinträchtigt, da sich nur wenige Zellen vom Coverslip abgelöst hatten.

Um zu untersuchen, welche der α -PIX-Domänen einen regulatorischen Einfluss auf die Podosomenbildung ausübt, wurden verschiedene Trunkationsmutanten in primären humanen Makrophagen überexprimiert. Die Überexpression des dominant negativen α -PIX-DN Konstrukts, welches keine GEF Aktivität mehr aufweist, zeigt im Vergleich zum α -PIX Wildtyp deutliche Unterschiede. So ähneln die transfizierten Zellen hinsichtlich ihrer Zell- und Podosomengestalt stark den unbehandelten Makrophagen. Im Gegensatz zum α -PIX-Wildtyp Konstrukt zeigen die mit α -PIX-DN transfizierten Zellen weder Podosomenaggregate, noch eine kleinere Zellgröße. Es kann daher angenommen werden, dass die modulatorischen Effekte von α -PIX von der GEF Aktivität des Proteins abhängig sind. Diese GEF Aktivität ist jedoch nicht für die Lokalisation des Proteins verantwortlich, da die dominant negative Mutante, genauso wie der Wildtyp im Podosomenring zu finden ist.

Wie weitere Experimente zeigen, scheint für die Lokalisation des α -PIX Proteins die über die GBD Domäne vermittelte Bindung an GIT1 eine Schlüsselrolle zu spielen. Die

Überexpression der GBD Trunktionsmutante (α -PIX- Δ GBD) zeigt keinerlei Assoziation mit dem Podosomenring mehr. Das Konstrukt ist diffus im Zytoplasma verteilt. Daher liegt die These nahe, dass die GIT-Bindung über die GBD Domäne wichtig für die Lokalisation von α -PIX an den Podosomenring ist. Ein denkbarer Mechanismus ist hier die Bindung von GIT an Paxillin (Rosenberger und Kutsche, 2006), ein Protein des Podosomenrings (Linder und Aepfelbacher, 2003). Neben der Beeinflussung der α -PIX-Lokalisation zeigt die Bindung an GIT1 leichte Effekte auf die Podosomen- und Zellgestalt. In 20% der Fälle waren die Zellen kleiner als die Kontrollzellen und die Verteilung der Podosomenanzahl war in Richtung der höheren Podosomenanzahl pro Zelle verschoben. Demnach kann man dem Trunktionskonstrukt eine Podosomen-stabilisierende Wirkung zuschreiben, was wiederum bedeutet, dass der Podosomenturnover durch die Bindung an GIT1 etwas beschleunigt wird. Dies steht allerdings im Widerspruch mit den Ergebnissen früherer Arbeiten, die zeigten, dass α -PIX zusammen mit GIT1 PAK aktivieren kann, dieser Prozess jedoch unabhängig von einer direkten Bindung dieser beiden Komponenten ist (Loo et al., 2004). Demnach müsste PAK auch bei einer unterbundenen α -PIX-GIT1 Bindung nahezu unverändert aktiviert werden. Diese Diskrepanz könnte durch die subzelluläre PAK-Verteilung an Podosomen erklärt werden. Es wurde bereits gezeigt, dass bereits die Akkumulation von α -PIX und GIT1 in einem lokal eng begrenzten Ausmass zur Aktivierung von PAK führt. Dafür ist aber die Co-Lokalisation aller drei Proteine notwendig, die aber allein durch die fehlende PIX-Lokalisation an den GIT1-enthaltenden Multiproteinkomplex und damit fehlende Translokation an das podosomale Kompartiment nicht gewährleistet ist. So könnte es sein, dass diese fehlende Anhäufung aller drei Proteine der Grund für die reduzierte PAK-Aktivierung und damit für den erniedrigten Podosomenturnover ist.

Unter den verschiedenen Isoformen dieser Proteine kristallisierten sich PAK4 und α -PIX als die physiologischen Podosomen-Regulatoren heraus. Die PAK- α -PIX Interaktion erfolgt durch die Bindung der prolinreichen PAK4 Domäne an die SH3-Domäne des α -PIX Proteins (Mott et al., 2005). Daher liegt es nahe, die Auswirkungen einer α -PIX- Δ SH3 Trunktionsmutante auf die Podosomenformation genauer zu untersuchen. Es ist bekannt, dass PAK über zwei Wege aktiviert werden kann. Zum einen GTPase-vermittelt, andererseits GTPase-unabhängig v.a. durch Bindung von α -PIX (Manser et al., 1998; Daniels et al., 1999). Speziell für PAK4 wurde gezeigt, dass es nur in sehr geringem Maße durch CDC42 aktiviert werden kann und deshalb nahezu vollständig GTPase-unabhängig durch α -PIX und andere Signalwege stimuliert werden muss (Abo et al., 1998). Weiter ist bekannt, dass die Bindung von PAK1 die GEF Aktivität von α -PIX stimulieren kann (Daniels et al., 1999). In dieser Arbeit wurden nun die Auswirkungen

einer fehlenden PAK4- α -PIX Interaktion auf die Podosomenbildung in primären humanen Makrophagen untersucht. Zu erwarten wären große Auswirkungen auf die Podosomenbildung, da einerseits die α -PIX vermittelte PAK-Aktivierung unterbunden ist und andererseits auch α -PIX-GEF Aktivität weniger stark aktiviert wird, was mit dem reduzierten Einfluß des CDC42 Signalwegs zu einer verminderten Aktinnukleation führen würde.

Erstaunlicherweise zeigte die Überexpression dieses Konstruktes in primären humanen Makrophagen nahezu identische Effekte wie die des α -PIX Wildtyps. Der Großteil der Zellen war signifikant kleiner und zeigte Podosomenaggregate. Die ringförmige Lokalisation des Konstrukts war weniger stark ausgeprägt als beim α -PIX Wildtyp Konstrukt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Effekte des α -PIX Wildtyp-Proteins nicht allein auf die Interaktion mit PAK zurückzuführen sind, sondern wohl auch durch die GEF Aktivität des Proteins gesteuert werden. Die duale Funktion von α -PIX als GEF für Rho GTPasen, sowie als Aktivator und Translokator für PAK, wie sie bereits für Fibroblastenzellen postuliert wurde, wird somit auch für primäre humane Makrophagen bestätigt (Manser et al., 1997; Feng et al., 2002; Feng et al., 2004; Rosenberger et al., 2006). Zu klären bleibt, ob diese PAK4-Aktivierung entgegen der momentanen Thesen doch GTPase-vermittelt ist oder ob sie durch andere Signalwege bewerkstelligt wird.

Zusätzlich konnte auch eine gewisse Dynamik hinsichtlich der Podosomengestalt festgestellt werden. So zeigten sich zunächst keine klar voneinander abgrenzbaren Podosomen mehr, dann kam es zur Bildung von Podosomenclustern bis die Podosomen schließlich komplett verschwanden und auch der zelluläre F-Aktin Gehalt abnahm. Dies könnte auf eine Erschöpfung der zellulären Kompensationsfähigkeit hinweisen, die mit zunehmender Expressionsstärke von α -PIX- Δ SH3 auftritt. Vor diesem Hintergrund wäre die anfängliche phänotypische Ähnlichkeit erklärbar. Solange die zelluläre Kompensation noch nicht ausgeschöpft ist, entspricht der Phänotyp dem des Wildtyps, erst danach kommen die Effekte der Trunktationsmutante zum Tragen, die letztendlich in einer Reduktion des F-Aktinanteils enden. Interessant vor diesem Hintergrund wären weitere Versuche, die die zeitliche und mengenmäßige Expression des Konstrukts und deren Auswirkungen genauer erfassen.

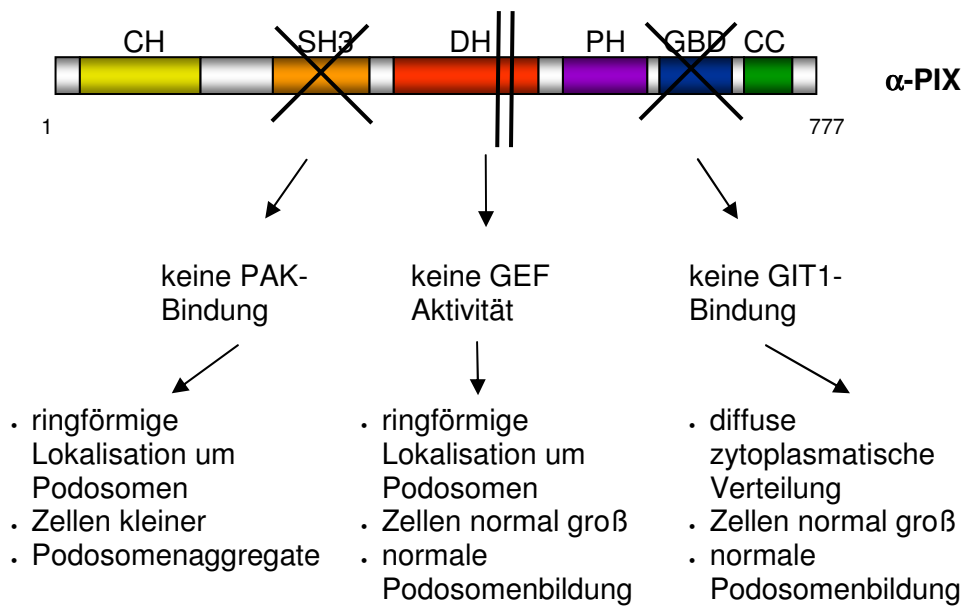


Abb. 4-4: Zusammenfassung Effekte der α-PIX-Konstrukte

4.4 GIT1

GIT1 und GIT2 sind als ubiquitär vorkommende Proteine mit Multidomänen-Struktur in diverse zelluläre Prozesse involviert. Vor allem GIT1 spielt bei der Integration verschiedener Signalwege der zellulären Migration und Protrusion eine wichtige Rolle (Turner et al., 2001). Die zelluläre GIT1-Lokalisation wird durch Interaktionen mit verschiedenen Proteinen wie beispielsweise RhoGTPasen, PAK, PIX, MEK1 oder Paxillin bestimmt. So ist für verschiedene Fibroblasten- und Endothelzelllinien bekannt, dass GIT1 zwischen drei verschiedenen Zellkompartimenten verkehrt: Zytosol, fokalen Adhäsionen und der Zellperipherie (Manabe et al., 2002), je nachdem, ob sich die Zelle in einem aktivierten Zustand befindet, bzw. mit welchem Effektorprotein GIT1 interagiert. Beispielsweise kann GIT1 als Bestandteil eines Multiproteinkomplexes durch Interaktion mit Paxillin an Fokale Komplexe lokalisieren (Turner et al., 1999). Genauso kann an PIX gebundenes PAK, vermittelt durch die PIX-GIT1 Interaktion, an Fokale Komplexe transloziert werden.

Bezüglich des PAK-PIX Signalwegs spielt GIT1 eine tragende Rolle als Gerüstprotein für die Lokalisation von PAK an Fokale Adhäsionen in Fibroblasten und Epithelzellen (Manabe et al., 2002). Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit GIT1 hinsichtlich seiner Expression und Lokalisation in primären humanen Makrophagen untersucht.

Durch Western Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass GIT1 auch in primären humanen Makrophagen exprimiert wird.

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurde die subzelluläre Lokalisation von GIT1 in primären humanen Makrophagen ermittelt. Die konfokalmikroskopische Analyse zeigte eine zytosolische Verteilung mit vorwiegender Lokalisation peri-podosomal und in der Zellperipherie. Zudem fällt auf, dass GIT1 im Gegensatz zu α -PIX oder PAK4 netzartig um Podosomen lokalisiert (vgl. Abb. 3-21 und Abb. 3-22). Dabei ist es nicht im Podosomen-Kern, aber teilweise in der Ringstruktur zu finden. Die Bindung von GIT1 an Paxillin, einem Protein der podosomalen Ringstruktur, scheint hier für die subzelluläre, peri-podosomale GIT1-Lokalisation verantwortlich zu sein (Übersicht bei: Linder et al., 2003; Turner et al., 1999). Demnach lokalisiert GIT1 an fokale Adhäsionen und Komplexe in CHO.K1 Zellen (Ovarialzellen des Hamsters) (Turner et al., 1999). Darüberhinaus konnte GIT1, genauso wie bereits für COS7 Zellen beschrieben, auch in der Zellperipherie von Makrophagen nachgewiesen werden (Botrugno et al., 2006).

Neuere Studien zeigen, dass GIT1 als Mitglied eines Multiproteinkomplexes mit an der Lokalisation von PAK an fokale Komplexe und fokale Adhäsionen beteiligt ist. Den Kern dieses Multiproteinkomplexes bildet PIX an welches PAK und GIT binden können. Für die weitere Lokalisation an fokale Adhäsionen ist die Bindung an ein weiteres Protein notwendig: Paxillin (Paris et al., 2000; Manabe et al., 2002; Matafora et al., 2001). Damit ist es möglich, getriggert durch äußere Reize, den Aktinturnover gezielt an Orten der Membranprotrusion während der Zellbewegung zu steuern. Dies wäre auch für humane Makrophagen denkbar, so könnte dieser Multiproteinkomplex auch an andere Orte der vermehrten Aktinfilamentturnover, hier z.B. den Podosomen, lokalisieren um vor Ort die Aktinfilamentreorganisation zu modellieren.

4.5 Interaktionsstudien

Die Zellmigration ist ein räumlich und zeitlich streng regulierter Prozeß, der durch die kontinuierliche Bildung und Auflösung von Adhäsionen gekennzeichnet ist. Gerade an der Zellfront migrierender Zellen, an der die gerichtete Zellprotrusion stattfindet, dient der streng regulierte, kontinuierliche Adhäsions-Turnover der Zellstabilisation und scheint dadurch eng mit der Zellprotrusion verknüpft zu sein. Podosomen, als typische Adhäsionsstrukturen mononukleärer Zellen, werden u.a. durch Aktin-modulatorische Signalkaskaden reguliert. Als möglicher Weg ist die CDC42-vermittelte PAK-PIX-GIT Interaktion beschrieben (Übersicht bei Rosenberger et al., 2006).

Anhand der bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit können folgende Aussagen gemacht werden: in primären humanen Makrophagen stellen α -PIX, PAK4 und GIT1 physiologische Podosomenregulatoren dar. Alle drei Proteine zeigen demnach auch eine Podosomen-assoziierte Lokalisation, wie Immunfluoreszenzfärbungen und die

Differenzielle Lyse bestätigen. So lokalisiert PAK4 im peri-podosomalen Bereich, α -PIX in Ringen um Podosomen und bedingt auch in Podosomenkernen und GIT1 an der podosomalen Ringstruktur, aber nicht im Podosomen-Kern. Auch durch differentielle-Lyse-Experimente konnten sowohl PAK4 als auch α -PIX im podosomalen Kompartiment nachgewiesen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die räumliche Nähe der Proteine auch funktionelle Hintergründe hat. So wurden in dieser Arbeit regulatorische Eigenschaften der Proteine α -PIX und PAK4 hinsichtlich der Podosomenbildung in primären humanen Makrophagen nachgewiesen. Über die PAK-PIX Interaktion als solches gibt es in primären humanen Makrophagen noch keine näheren Erkenntnisse. In verschiedenen Zelllinien konnte jedoch eine Interaktion nachgewiesen werden, beispielsweise von α -PIX mit PAK1 in glatten Muskelzellen (Webb et al., 2005).

4.5.1 PAK4- α -PIX Interaktion

Die bereits in der vorliegenden Arbeit beschriebene Lokalisation von PAK4 und α -PIX an den Podosomen-Kernen primärer humaner Makrophagen erinnert an die von PAK1 und β PIX, welche an Fokalen Adhäsionen in Hela Zellen und Fibroblasten beobachtet wurde (Manser et al., 1998; Turner et al., 1999; Zhao et al., 1998). In der Tat wurde gezeigt, dass PAK und PIX eine wichtige Rolle hinsichtlich der Aufrechterhaltung Fokaler Adhäsionen spielen (Stofega et al., 2004). In der Literatur sind bereits mehrere Veröffentlichungen über die Interaktion zwischen PAK- und PIX-Isoformen in verschiedenen Zellen, z.B. HeLa, Fibroblasten und Cos7 Zellen zu finden (Bagrodia et al., 1999; Manser et al., 1998). Mott et al., analysierten diese Interaktion mittels der NMR- (*nuclear magnetic resonance*; Kernspin-) Technologie auf struktureller Ebene und konnten Aussagen über die an der Bindung beteiligten Aminosäurereste geben (Mott et al., 2005). Kürzlich wurde die Interaktion von PAK1 mit β PIX auch in glatten Muskelzellen nachgewiesen, die Phorbol-ester-induziert zumindest vorübergehend Podosomen bilden können (Webb et al., 2005). Allerdings wurden bisher noch keine Interaktionsstudien in Zellen durchgeführt, die Podosomen konstitutiv ausbilden, weshalb in der vorliegenden Arbeit nun die PAK4- α -PIX Interaktion in primären humanen Makrophagen untersucht wurde.

Durch sog. Co-Immunpräzipitation sollte untersucht werden, ob PAK4 und α -PIX in primären humanen Makrophagen miteinander interagieren. Die Versuchsdurchführung gestaltete sich im Verlauf sehr schwierig, da sich die in Vorversuchen ermittelten Optimalbedingungen für die jeweiligen Immunpräzipitationen deutlich unterschieden und die Expression der Proteine sehr gering war. Ausgiebige Optimierungsversuche der Co-Immunpräzipitations-Bedingungen brachten leider nicht den erwarteten Fortschritt. Auch

andere Lösungsansätze wie beispielsweise die Überexpression eines Interaktionspartners oder ein sog. *preclean*, die Verminderung der Bindung unspezifischer Proteine, war nicht erfolgreich, so dass die Interaktion beider Proteine letztlich nur in HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) bestätigt werden konnte. Hier konnte die geringe Proteinexpression durch eine entsprechend hohe Anzahl an Parallelansätzen ausgeglichen werden, was mit Monozyten nicht verwirklichtbar gewesen wäre.

Interessanterweise waren andere Forschungsgruppen offensichtlich mit ähnlichen Problemen konfrontiert. So wiesen Mayhew et al., die auch weitere Interaktionspartner des PAK1- β PIX-GIT1-Paxillin Signalmoduls ausfindig machten, in ihrer Studie auf den problematischen Interaktionsnachweis dieser und assoziierter Proteine in Wirbeltierzellen hin. Zur Optimierung der Detektion der Proteine in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) wurde besonders auf Expressionslevel, die annähernd denen der endogenen Proteinexpression waren, sowie auf die Verwendung von Phosphataseinhibitoren Wert gelegt. So wurde gerade hier die wichtige Rolle der Phosphataseinhibitoren für den Nachweis von β PIX in PAK1 Immunpräzipitationen unterstrichen (Mayhew et al., 2006). Beide Optimierungsansätze wurden auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt, zeigten jedoch nur bedingt Wirkung.

Bisher konnte in Publikationen nur die Interaktion von PAK1 mit β PIX nachgewiesen werden, wohingegen keine Interaktion von PAK4 mit PIX gezeigt werden konnte (Wells et al., 2002; Webb et al., 2005). Auch die, im Vergleich zu PAK1, veränderte Anordnung der SH3 Bindungsdomänen N-terminal der GBD deutete darauf hin, dass PAK4 nicht an PIX oder Nck binden kann (Abo et al., 1998).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass PAK4 mit α -PIX in HUVEC interagiert. Desweiteren liegen deutliche Hinweise vor (Lokalisation, Trunktionsmutanten), dass beide Proteine auch in primären humanen Makrophagen interagieren.

4.5.2 α -PIX-GIT1 Interaktion

Wie bereits unter Punkt 4.4 beschrieben, bilden PAK, PIX und GIT einen Multiproteinkomplex, der u.a. die Aufgabe hat, PAK an Fokale Komplexe zu translozieren. Für diese Translokation stellt PIX ein wichtiges Bindeglied dar: einerseits bindet es an PAK, andererseits erfolgt die Lokalisation an Fokale Komplexe durch die Interaktion mit GIT1 (Di Cesare et al., 2000; Matafora et al., 2001). Das PAK Protein hat so die Möglichkeit seine Funktion in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation auszuüben. In COS7 Zellen konnte die endogene GIT1- β PIX Interaktion bereits mittels Immunpräzipitation gezeigt werden (Premont et al., 2000; Botrugno et al., 2005). In der

vorliegenden Arbeit konnte dies auch in HUVEC und primären humanen Makrophagen bestätigt werden.

4.5.3 PAK4-GIT1 Interaktion

Im PAK-PIX-GIT Signalmodul sind PAK und GIT1 indirekt durch PIX verbunden. So interagieren GIT Proteine mit PIX und dadurch indirekt auch mit PIX-Interaktionspartnern, wie z.B. PAK (Bagrodia et al., 1999; Turner et al., 1999; Premont et al., 2000; Zhao et al., 2000). In Fibroblasten co-lokalisiert PAK mit GIT1 in den zytoplasmatischen Komplexen. Die essentielle Rolle von PIX als Bindeglied zwischen PAK und GIT1 wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass eine PAK-Trunktationsmutante, die nicht mehr an PIX binden kann, keine Co-Lokalisation mit GIT1-Komplexen mehr zeigt (Manabe et al., 2002). Bisher wurde noch keine erfolgreiche Co-Immunpräzipitation von GIT1 mit PAK in der Literatur beschrieben. Auch in primären humanen Makrophagen konnte keine Interaktion beider Proteine festgestellt werden. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Bindung beider Proteine an PIX, welches eine indirekte Assoziation bewirkt. Theroretisch wäre es möglich PAK4 bzw. GIT1 bei einer Co-Immunpräzipitation von PIX mitzuerfassen. Jedoch zeigten diesbezügliche Experimente dieser Arbeit, dass dies aufgrund der sich deutlich unterscheidenden Präzipitationsbedingungen sowie der geringen Expressionsstärke in primären humanen Makrophagen nicht verwirklichtbar und auch in HUVEC nicht realisierbar ist.

4.6 Modell der Podosomenregulation in Makrophagen

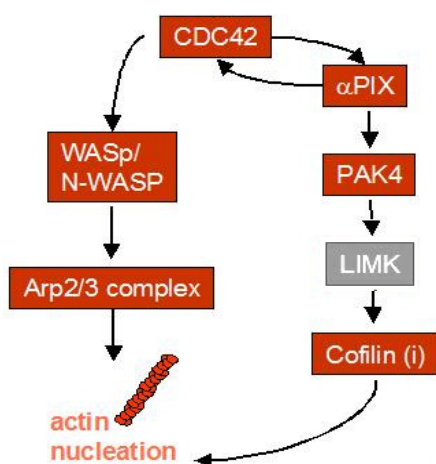


Abb. 4-5: Modell der Aktinregulation durch CDC42

Bisher wurde, basierend auf Erkenntnissen der Aktinregulation in anderen Zellsystemen, folgender Zusammenhang hinsichtlich der Podosomenregulation angenommen.

Es ist bekannt, dass CDC42 essentiell für die gerichtete Migration in Leukozyten ist. Dies geschieht durch die streng regulierte räumliche Verteilung der Aktinpolymerisation, die zuvor durch externe Signale induziert wurde (Allen et al., 1998; Srinivasan et al., 2003).

Die Podosomenregulation erfolgt u.a. durch RhoGTPase-vermittelte und Aktin-regulatorische Signalwege (Letho et al., 1982; Chellaiah et al., 1998; Linder et al., 1999; Tatin et al., 2006). Für alle drei Hauptvertreter der RhoGTPasen, RhoA, Rac1 und CDC42, wurde ein Einfluß auf die Podosomenregulation nachgewiesen und v.a. die Wichtigkeit des CDC42-(N-)WASP-Arp2/3 Weges für die podosomale Aktinnukleation unterstrichen (Linder et al., 1999; Chellaiah et al., 2000; Burns et al., 2001; Berdeaux et al., 2004). Für die Aktin-regulatorischen Signalwege scheint PAK in zweierlei Hinsicht von zentraler Bedeutung zu sein. Einerseits ist es an der LIMK-vermittelten Regulation der Aktinnukleation beteiligt (Edwards et al., 1999; Cau et al., 2005), andererseits fungiert es als Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, der Aktin-regulatorische Proteine gezielt an die Zellfront transloziert, die dort die lokale Aktinregulation unterstützen (DiCesare et al., 2000; Matafora et al., 2001).

Gerade in hoch motilen Zellen, wie z.B. Makrophagen, ist neben der Protrusion auch eine strenge Regulation der Adhäsion notwendig, die zur Stabilisation der Zelle beiträgt. Die Verbindung dieser zwei Zelleigenschaften wird als *adhesion-protrusion-coupling* bezeichnet. Makrophagen, als Zellen des *Mononukleären Phagozytose Systems (MPS)*, bilden Podosomen als Adhäsionsstrukturen aus, die eine hohe Dynamik aufweisen und einen Aktin-reichen Kern enthalten. In dieser Arbeit wurde die Rolle des Cofilin-Effektorproteins PAK und dessen Interaktionspartners PIX hinsichtlich der Podosomenregulation in primären humanen Makrophagen untersucht. Folgendes Modell kann für die Stellung und Funktion dieser Proteine in der Aktin-regulatorischen Signalkaskade primärer humaner Makrophagen angenommen werden:

1. Translokation

Die subzelluläre PAK Verteilung ist Aktivierungs-abhängig. So befindet sich PAK in ruhenden Zellen in Zytosol, wohingegen es in stimulierten Zellen an Podosomen, Fokalen Adhäsionen und *ruffles* lokalisiert. PAK enthält jedoch keine eigene „Translokationsdomäne“ und ist daher auf die Hilfe seiner Interaktionspartner angewiesen. Für Fibroblasten und Endothelzellen ist bekannt, dass PAK als Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, der auch PIX, GIT1 und Paxillin enthält, an fokale Adhäsionen transloziert wird. (Turner et al., 1999; Zhao et al., 2000; Manabe et al., 2002). Für glatte Muskelzellen wurde bereits die direkte Interaktion von PAK1 und β PIX und deren Einfluß auf die Podosomenbildung nachgewiesen (Webb et al., 2005). In dieser Arbeit konnte die direkte Interaktion von PAK4 und α -PIX nur für HUVEC - und nicht für primäre humane

Makrophagen - bestätigt werden, dennoch deuten Lokalisationsstudien aller drei Proteine und der Interaktionsnachweis von GIT1 und α -PIX stark auf eine Assoziation der Proteine in primären humanen Makrophagen hin. So wäre es denkbar, dass PAK4 und α -PIX zwar nicht direkt interagieren, aber indirekt im Multiproteinkomplex miteinander assoziiert sind. Dieser Komplex wandert zwischen dem zytoplasmatischen Pool, Adhäsionen und dem *leading edge*. Durch Interaktion von Paxillin mit GIT1 kommt es zu Lokalisation an neu entstehende Podosomen oder andere Adhäsionen und Membranprotrusionen, wodurch auch die anderen Komponenten des Komplexes vor Ort gebracht werden. Dort kann PAK die Aktinpolymerisation und damit die Migrationsfähigkeit der Zelle regulieren (Sells et al., 1997; Manser et al., 1997; Zhao et al., 2000). PIX als GEF kann die Rac-vermittelte Aktin-Polymerisation aktivieren. Da sich am rückwertigen Ende der migrierenden Zelle die Adhäsionen wieder auflösen, wandern die GIT1-Module in Richtung des Zellkörpers, wo sie, möglicherweise gebunden an Endosomen, wieder für das *targeting* des Multiproteinkomplexes zur Verfügung stehen.

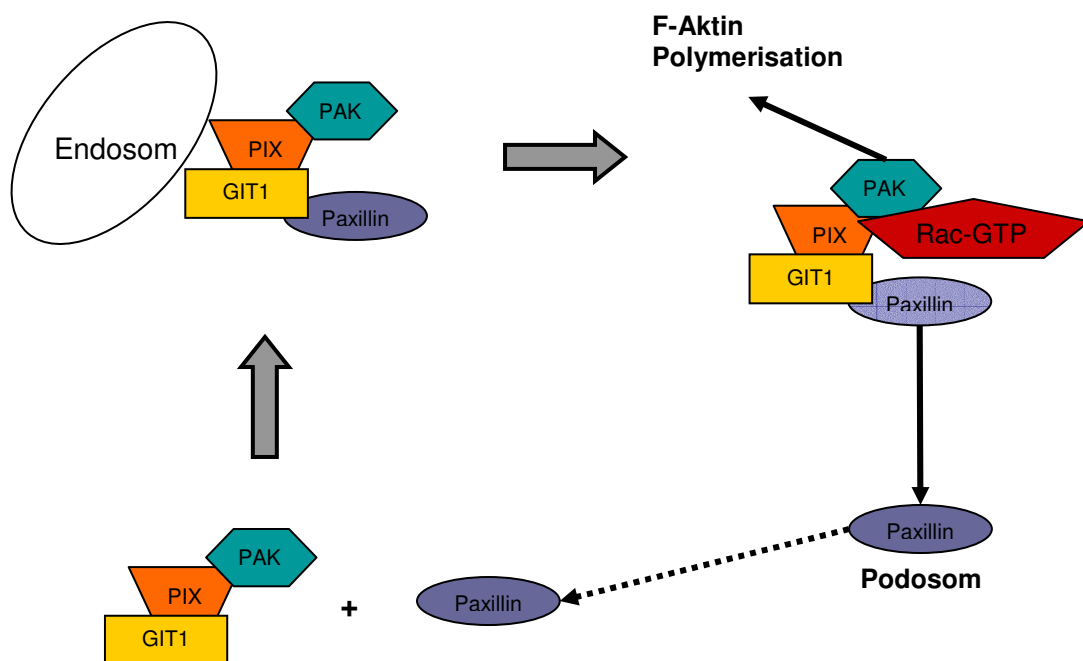


Abb. 4-5: Der Zyklus des GIT1-PIX-PAK Komplexes zwischen dem endosomalen Kompartiment und der Plasmamembran (modifiziert nach Rosenberger et al., 2005)

2. Am Podosom

Durch die Lokalisation am Podosom tragen PAK4 und α -PIX vor Ort zur Podosomenregulation bei. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass endogenes PAK4 die Podosomengröße und -anzahl in primären humanen Makrophagen entscheidend beeinflusst. Dies ist abhängig von der Kinaseaktivität und von der

Abwesenheit der autoinhibitorischen PBD was einer Aktivierung entspricht. α -PIX beeinflusst die Podosomengestalt und damit verbunden auch die Podosomenanzahl, was teilweise auf der GEF Aktivität des Proteins basiert. Wie bereits beschrieben, scheint die direkte Interaktion beider Proteine in primären humanen Makrophagen keine tragende Rolle zu spielen. Es ist jedoch unumstritten, dass PAK und PIX Teile eines Multiproteinkomplexes sind und ein gemeinsamer Einfluß von α -PIX und PAK4 auf Podosomen daher sehr gut denkbar ist (Turner et al., 1999; Manabe et al., 2002; Premont et al., 2004; Rosenberger and Kutsche, 2006). Die Tatsache, dass beide Proteine sowohl *upstream* als auch *downstream* von RhoGTPasen agieren, legt nahe, dass sie durch lokalisierte *feedback loops* in der Lage sind, RhoGTPase-transduzierte Signale lokal fokussiert zu verstärken.

Beispielsweise ist für PAK4 bekannt, dass es durch Aktivierung von LIM Kinasen, die wiederum Cofilin inaktivieren können, zur reduzierten F-Aktin-Depolymerisierung kommt (Abo et al., 1998; Edwards et al., 1999; Dan et al., 2001). Weiterhin ist PAK4 in der Lage die Cofilin-Phosphatase *slingshot* zu inaktivieren und damit wiederum Einfluß auf die Aktinpolymerisierung zu nehmen (Soosairajah et al., 2005).

Die Ergebnisse der Lokalisationsstudien der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass PAK4 und α -PIX die Aktin-depolymerisierenden Signalwege an der Übergangszone zwischen Podosomenkern und –ringstruktur regulieren. Dies geschieht über Restriktion oder Förderung der Aktinfilament-Formation, was jeweils zu kleineren oder größeren Podosomenkernen führt. Die vermehrte Aktivierung von PAK4 könnte vermittelt durch LIMK und Cofilin zu einer Zone lokal herab-regulierter F-Aktin-Auflösung führen und daher die Ausbreitung des F-Aktin-reichen Podosomenkerns vergrößern. Eine verminderte PAK4 Aktivität würde über eine verstärkte Cofilin-Aktivität zu einem geringeren F-Aktingehalt und damit einem kleineren Podosomenkern führen.

Primäre humane Makrophagen zeigen unter vermehrter α -PIX Expression Podosomen-Aggregate. Möglicherweise ist dies auf die Erweiterung der Grenzen der Podosomenkerne, bis hin zur Fusion mehrerer Podosomen, zurückzuführen.

Interessanterweise konnte durch Mayhew et al. nachgewiesen werden, dass Cofilin mit allen vier Proteinen des PAK1- β PIX-GIT1-Paxillin Komplexes interagiert (Mayhew et al., 2006). Dies zeigt die enge funktionelle und räumliche Verknüpfung weiterer Effektorproteine wie z.B. Cofilin mit Komponenten des Multiproteinkomplexes. Ähnlich steht es mit den PP2A Phosphataseinhibitoren PHAPI und PHAPII, die in β PIX und PAK1 Immunpräzipitaten nachgewiesen werden konnten, was auf eine streng vernetzte Phospho-Regulation fokaler Adhäsionen durch Phosphatasen und Phosphatase-Protein-Inhibitoren hinweist (Mayhew et al., 2006).

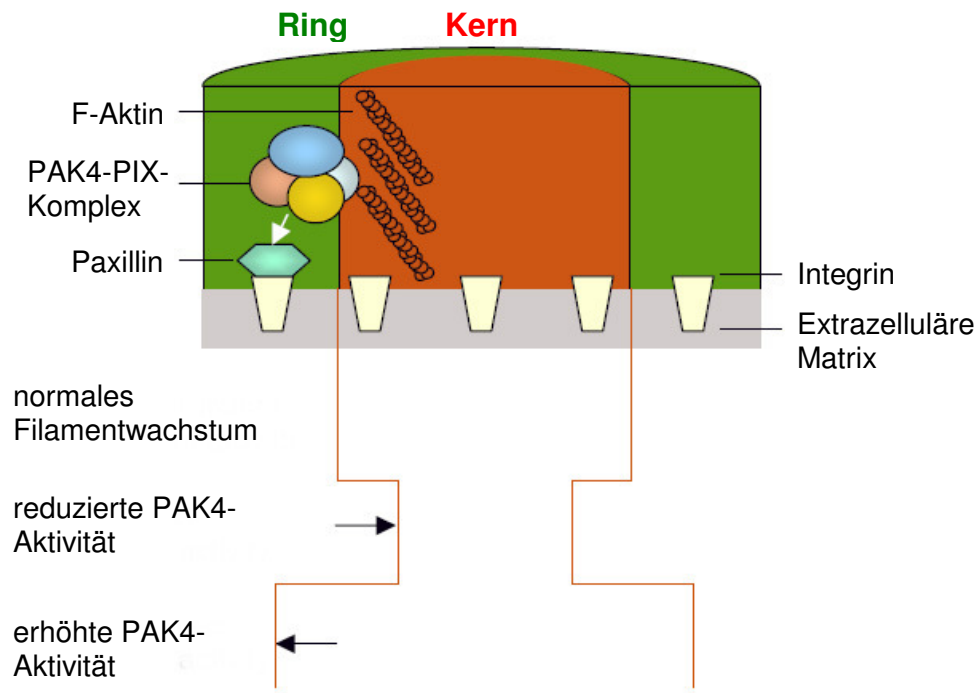


Abb. 4-6: Modell der Podosomenregulation - Einzelheiten s. Text (aus Gringel et al., 2006)

5 Ausblick

In dieser Arbeit konnten Aussagen über die subzelluläre Lokalisation und die Beeinflussung der Podosomenbildung durch Cofilin, PAK4, α PIX und GIT1 in primären humanen Makrophagen getroffen werden. Bei den Experimenten lag das Augenmerk v.a. auf der Expression entsprechender Konstrukte zu verschiedenen Zeitpunkten, der zeitliche Ablauf konnte damit nur ansatzweise nachvollzogen werden. Für diese Fragestellungen eignen sich beispielsweise sog. *live cell* Versuche. Hierbei werden lebende Makrophagen mit einem fluoreszenzmarkiertem Konstrukt transfiziert, inkubiert und anschließend unter einem Mikroskop mit spezieller Inkubationskammer untersucht. Erste Versuche z.B. zur Erfassung der Cofilindynamik wurden mit GFP-Cofilin auch von mir durchgeführt. Allerdings bleichte mRFP-Aktin zu schnell aus, so dass die Analyse eines angemessen langen Zeitraums nicht möglich war. Nach Umklonierung von Aktin in einen Vektor mit stabilerem Fluoreszenz-tag (z.B. mCherry) sollte man nochmals die Cofilindynamik mittels *live cell* Experimenten untersuchen. Auch *live cell* Untersuchungen der verschiedenen Komponenten des Multiproteinkomplexes während der Translokation an Adhäsionen wären sehr aufschlussreich und interessant.

In dieser Arbeit wurde auch die strukturelle Konsequenz der Aktinregulation, die Veränderung der Podosomengestalt und -anzahl, analysiert. Über die interne Aktindynamik ist jedoch mit diesem Versuchsansatz keine Aussage möglich. Hierzu könnten weitere Versuche mit der FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*)-Technologie weiterhelfen.

Der Interaktionsnachweis von PAK4 mit α PIX mittels der Immunpräzipitation konnte in dieser Arbeit nur in HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) erbracht werden. Die optimalen Bedingungen für das jeweilige Protein unterschieden sich zu stark, und die Expression der Proteine in humanen Makrophagen war zu gering. Eine sensitivere Möglichkeit, die Interaktion dieser beiden Proteine in humanen Makrophagen nachzuweisen wäre beispielsweise die Einbeziehung von Massenspektrometrie.

Makrophagen von Patienten mit dem sog. Wiskott Aldrich Syndrom haben keine Podosomen. Es wird angenommen, dass aufgrund dessen die Migrationsfähigkeit der Makrophagen und damit die zelluläre Immunität eingeschränkt ist. Interessant wäre hier ob und in welcher Ausprägung in diesen defizitären Zellen die Expression, Lokalisation und Interaktion von PAK4 und α PIX vorliegt bzw. eingeschränkt ist.

Umgekehrt wäre der podosomale Phänotyp von Patienten mit einer PAK4 Genmutation interessant. Existieren Podosomendefekte und welche funktionellen Auswirkungen ziehen diese nach sich?

6 Zusammenfassung

Podosomen sind als prominenter Bestandteil des Aktinzytoskeletts primärer humaner Makrophagen an verschiedenen Zellfunktionen wie Adhäsion, Matrixabbau und gerichteter Migration beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation dieser speziellen Zellstrukturen durch Aktin-regulatorische Proteine, insbesondere Cofilin, *p21-activated kinase* (PAK) und deren Interaktionspartner *PAK-interacting-exchange factor* (PIX), untersucht.

Cofilin, das die Depolymerisierung von Aktinfilamenten beschleunigt und durch Phosphorylierung am Ser-3 inaktiviert werden kann, ist ein bedeutender Regulator des Aktinzytoskeletts. In vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bereits erste Ergebnisse hinsichtlich der wichtigen Rolle Cofilins bezüglich der Podosomenregulation herausgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Cofilin Wildtyp und zwei Ser-3 Mutanten genauer untersucht. Es konnten folgende Aussagen über die subzelluläre Lokalisation und den Einfluß auf die Podosomenbildung gemacht werden: Cofilin lokalisiert in und um Podosomen, hierfür ist die Bindung an F-Aktin Voraussetzung; für die Beeinflussung der Podosomenbildung ist die Bindung an F-Aktin und die strikte Regulation des Aktivitätszustands im Cofilinmolekül unabdingbar. So zeigt die konstitutiv aktive Mutante eine deutliche Reduktion des Podosomengehalts pro Zelle.

PAK ist ein weiterer wichtiger Regulator des Aktinfilament-Turnovers. PAK Proteine werden isotypspezifisch in einer Vielzahl von Zellen exprimiert. PAK4 konnte durch Immunfluoreszenz-Färbungen, im *gene array*, mittels Differentieller Lyse und im Western Blot als die physiologisch relevante Podosomen-regulatorische Isoform in primären humanen Makrophagen ermittelt werden. Im Einklang damit steht auch die Beobachtung, dass PAK4 eng mit der podosomal Zell-Fraktion in primären humanen Makrophagen assoziiert ist. Mittels Überexpression verschiedener PAK4-Trunkationsmutanten und spezifischen PAK4-shRNA Versuchen konnte der Einfluß dieses Proteins auf die Podosomenbildung gezeigt werden. Die knock down Versuche bestätigten die wichtige Rolle von PAK4 für die Podosomenexpression. Mit Hilfe von PAK4-Trunkationsmutanten konnte gezeigt werden, dass v.a. eine intakte CDC42 Binde- und Kinasedomäne wichtig für die Podosomenbildung in primären humanen Makrophagen ist. Weiter wurden die Effekte einer Kinase-inaktiven und einer konstitutiv aktiven PAK4 Mutante qualitativ und quantitativ evaluiert. Die Kinase-inaktive Mutante führte zu einer Reduktion des F-Aktin mit kleineren Podosomen mit vermindertem F-Aktin-Gehalt, wohingegen die Kinase-aktive Mutante große Podosomen mit erhöhtem F-Aktingehalt bewirkte. Dies spricht für einen modulierenden Einfluß der PAK4 Kinaseaktivität auf die Aktin-Regulation in Podosomen und damit auf die Podosomengröße.

Proteine der PIX-Familie, die Interaktoren von PAK darstellen, konnten durch Immunfluoreszenzfärbungen und Differentielle Lyse Experimente ringförmig um Podosomen lokalisiert werden. Aufgrund der Kreuzreaktion erhältlicher Antikörper konnte jedoch keine Aussage zu den spezifischen PIX Isoformen (α - bzw. β -PIX) gemacht werden.

Überexpressionsstudien verschiedener α -PIX Trunktionsmutanten zeigten, dass α -PIX die Podosomengröße und gleichzeitig auch die Podosomenanzahl beeinflusst. Diese Effekte sind v.a. auf eine intakte GEF (*guanine nucleotide exchange factor*)-Funktion des Proteins zurückzuführen. Interessanterweise führte eine Überexpression von α -PIX-Wildtyp sowie die SH3 Mutante, die nicht mit PAK interagieren kann zu sehr ähnlichen Phänotypen: es zeigen sich vermehrt Aggregate aus Podosomen. Diese α -PIX Effekte scheinen somit keine direkte Interaktion mit PAK vorauszusetzen. Dennoch war davon auszugehen, dass sich die Effekte beider Proteine hinsichtlich der Podosomenregulation gegenseitig beeinflussen.

Diese Vermutung sollte mit Interaktionsstudien untersucht werden. Es ist bekannt, dass PAK und PIX als Bestandteile eines Multiproteinkomplexes in verschiedenen Zelltypen vorkommen. Diese Interaktion konnte aufgrund versuchstechnischer Probleme für die Isoformen PAK4 und α -PIX nur in HUVEC und nicht in primären humanen Makrophagen nachvollzogen werden. Für die Interaktion von α -PIX und GIT1 konnte auch der Beweis in primären humanen Makrophagen erbracht werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass PAK4 und α -PIX zwar nicht direkt interagieren, aber dennoch als Teile eines Multiproteinkomplexes miteinander in Verbindung stehen und dies für die Podosomenbildung notwendig ist.

GIT1 (*G-protein coupled receptor kinase interacting protein target 1*), als weiterer Teil des Multiproteinkomplexes, vermittelt durch die Bindung an Paxillin die Lokalisation des gesamten Komplexes an fokale Adhäsionen. In dieser Arbeit konnte GIT1 mittels Western Blot und Immunfluoreszenz auch in primären humanen Makrophagen nachgewiesen werden. Es lokalisiert peri-podosomal und in der Zellperipherie.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch die Expression von Trunktionsmutanten, Lokalisations- und Interaktionsstudien eingehende Erkenntnisse bezüglich der podosomal Signaltransduktion in primären humanen Makrophagen gewonnen, die im folgenden Modell zum Ausdruck kommen (s. Abb. 6-1):

PAK4 und α PIX lokalisieren am Übergang zwischen Kern- und Ringstruktur, wo sie durch Regulation des Aktin-turnovers die Größe von Podosomen beeinflussen. Dies könnte durch LIMK und Cofilin-vermitteltes *severing* von Aktin-filamenten geschehen, was zu einem vermehrten Aktinumbau führt. Des Weiteren sind PAK4, α PIX und GIT1 Bestandteile eines Multiproteinkomplexes, der u.a. die Aufgabe hat die Proteine an Fokale

Adhäsionen und Podosomen zu lokalisieren, damit sie *vor Ort* den Aktinturnover regulieren können. Alle drei Proteine haben Podosomen-spezifische Aufgaben: PAK4 kann, wie bereits oben beschrieben, den Aktinturnover über LIMK und Cofilin regulieren. Die tragende Rolle von α PIX hinsichtlich der Lokalisation am Podosom wird deutlich, wenn man sich vergegenwärtigt, dass PAK4 keine eigene Lokalisationsdomäne an Podosomen besitzt und die PAK Effekte u.a. durch die subzelluläre Lokalisation des Proteins reguliert werden. PAK4 ist so auf die Hilfe seiner Interaktionspartner im PAK-PIX-GIT-Paxillin Multiproteinkomplex angewiesen. α -PIX trägt am Podosom auch direkt zur Aktinregulation bei: als GEF kann es Rac aktivieren, was zur verstärkten Aktinfilament-Initiierung durch Arp2/3 Komplex führt. GIT1 fungiert als Trägerprotein, welches den Multiproteinkomplex über Paxillin an das Podosom bindet.

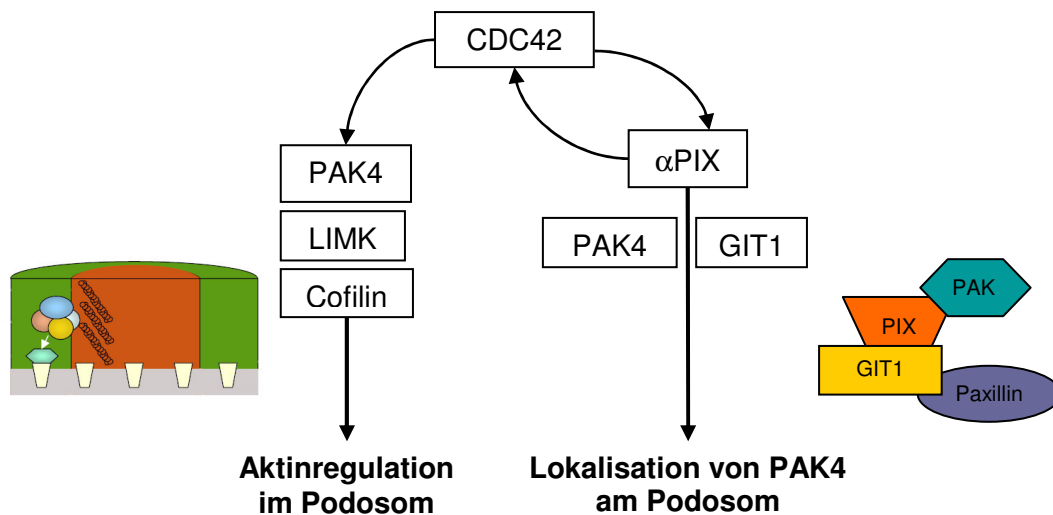


Abb. 6-1: Modell des Podosomen-regulatorischen Signalwegs in primären humanen Makrophagen (Einzelheiten siehe Text).

7 Literatur

- Abo A, Qu J, Cammarano MS, et al.** 1998 PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *Embo J* 17:6527-40
- Adam L, Vadlamudi R, Kondapaka SB, Chernoff J, Mendelsohn J, Kumar R** 1998 Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase. *J Biol Chem* 273:28238-46
- Aderem A, Underhill DM** 1999 Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623
- Ahmed T, Shea K, Masters JR, Jones GE, Wells CM** 2008 A PAK4-LIMK1 pathway drives prostate cancer cell migration downstream of HGF. *Cell Signal* 20:1320-8
- Akira S** 2003 Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15:5-11
- Akira S, Sato S** 2003 Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis* 35:555-62
- Allen WE, Zicha D, Ridley AJ, Jones GE** 1998 A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol* 141:1147-57
- Amann KJ, Pollard TD** 2001 The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol* 3:306-10
- Amano M, Ito M, Kimura K, et al.** 1996 Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271:20246-9
- Ambach A, Saunus J, Konstandin M, Wesselborg S, Meuer SC, Samstag Y** 2000 The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30:3422-31
- Aqel NM, Ball RY, Waldmann H, Mitchinson MJ** 1984 Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 53:265-71
- Arai H, Atomi Y** 2003 Suppression of cofilin phosphorylation in insulin-stimulated ruffling membrane formation in KB cells. *Cell Struct Funct* 28:41-8
- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, et al.** 1998 Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393:805-9
- Aronheim A, Broder YC, Cohen A, Fritsch A, Belisle B, Abo A** 1998 Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol* 8:1125-8
- Aspenstrom P, Fransson A, Saras J** 2004 Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 377:327-37
- Babb SG, Matsudaira P, Sato M, Correia I, Lim SS** 1997 Fimbrin in podosomes of monocyte-derived osteoclasts. *Cell Motil Cytoskeleton* 37:308-25
- Bagrodia S, Cerione RA** 1999 Pak to the future. *Trends Cell Biol* 9:350-5

- Bagrodia S, Derijard B, Davis RJ, Cerione RA** 1995 Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 270:27995-8
- Bagrodia S, Taylor SJ, Jordon KA, Van Aelst L, Cerione RA** 1998 A novel regulator of p21-activated kinases. *J Biol Chem* 273:23633-6
- Bailly M, Jones GE** 2003 Polarised migration: cofilin holds the front. *Curr Biol* 13:R128-30
- Baird D, Feng Q, Cerione RA** 2005 The Cool-2/ α -Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade. *Curr Biol* 15:1-10
- Balcer HI, Goodman AL, Rodal AA, et al.** 2003 Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, cofilin, profilin, and Aip1. *Curr Biol* 13:2159-69
- Bamburg JR** 1999 Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:185-230
- Bamburg JR, McGough A, Ono S** 1999 Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol* 9:364-70
- Benner GE, Dennis PB, Masaracchia RA** 1995 Activation of an S6/H4 kinase (PAK 65) from human placenta by intramolecular and intermolecular autophosphorylation. *J Biol Chem* 270:21121-8
- Berdeaux RL, Diaz B, Kim L, Martin GS** 2004 Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J Cell Biol* 166:317-23
- Bernards A** 2003 GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochim Biophys Acta* 1603:47-82
- Bernstein BW, Bamburg JR** 1982 Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF). *Cell Motil* 2:1-8
- Bernstein BW, Painter WB, Chen H, Minamide LS, Abe H, Bamburg JR** 2000 Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 47:319-36
- Billottet C, Rottiers P, Tatin F, et al.** 2008 Regulatory signals for endothelial podosome formation. *Eur J Cell Biol* 87:543-54
- Blanchoin L, Pollard TD, Hitchcock-DeGregori SE** 2001 Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr Biol* 11:1300-4
- Blanchoin L, Pollard TD, Mullins RD** 2000 Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol* 10:1273-82
- Bokoch GM** 2003 Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* 72:743-81
- Bokoch GM, Reilly AM, Daniels RH, et al.** 1998 A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active

lipids. *J Biol Chem* 273:8137-44

Bokoch GM, Wang Y, Bohl BP, Sells MA, Quilliam LA, Knaus UG 1996 Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). *J Biol Chem* 271:25746-9

Botrugno OA, Paris S, Za L, et al. 2006 Characterization of the endogenous GIT1-betaPIX complex, and identification of its association to membranes. *Eur J Cell Biol* 85:35-46

Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54

Brown JL, Stowers L, Baer M, Trejo J, Coughlin S, Chant J 1996 Human Ste20 homologue hPAK1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr Biol* 6:598-605

Brown MC, Turner CE 2004 Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* 84:1315-39

Brown MC, West KA, Turner CE 2002 Paxillin-dependent paxillin kinase linker and p21-activated kinase localization to focal adhesions involves a multistep activation pathway. *Mol Biol Cell* 13:1550-65

Buccione R, Orth JD, McNiven MA 2004 Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:647-57

Burbelo PD, Drechsel D, Hall A 1995 A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem* 270:29071-4

Burgstaller G, Gimona M 2005 Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H3001-5

Burns S, Thrasher AJ, Blundell MP, Machesky L, Jones GE 2001 Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* 98:1142-9

Calle Y, Chou HC, Thrasher AJ, Jones GE 2004 Wiskott-Aldrich syndrome protein and the cytoskeletal dynamics of dendritic cells. *J Pathol* 204:460-9

Callow MG, Clairvoyant F, Zhu S, et al. 2002 Requirement for PAK4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines. *J Biol Chem* 277:550-8

Carlier MF 1989 Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int Rev Cytol* 115:139-70

Carlier MF, Laurent V, Santolini J, et al. 1997 Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* 136:1307-22

Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, et al. 2007 Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* 26:784-97

Castellano F, Le Clainche C, Patin D, Carlier MF, Chavrier P 2001 A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *Embo J* 20:5603-14

Cau J, Hall A 2005 Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J Cell Sci* 118:2579-87

- Chan AY, Bailly M, Zebda N, Segall JE, Condeelis JS** 2000 Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J Cell Biol* 148:531-42
- Chellaiah M, Fitzgerald C, Alvarez U, Hruska K** 1998 c-Src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 273:11908-16
- Chellaiah MA, Biswas RS, Yuen D, Alvarez UM, Hruska KA** 2001 Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate directs association of Src homology 2-containing signaling proteins with gelsolin. *J Biol Chem* 276:47434-44
- Chen WT, Olden K, Bernard BA, Chu FF** 1984 Expression of transformation-associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J Cell Biol* 98:1546-55
- Chew TL, Masaracchia RA, Goeckeler ZM, Wysolmerski RB** 1998 Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J Muscle Res Cell Motil* 19:839-54
- Chhabra D, Bao S, dos Remedios CG** 2002 The distribution of cofilin and DNase I in vivo. *Cell Res* 12:207-14
- Chong C, Tan L, Lim L, Manser E** 2001 The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J Biol Chem* 276:17347-53
- Condeelis J** 1993 Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol* 9:411-44
- Condeelis J** 2001 How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends Cell Biol* 11:288-93
- Condeelis J, Pollard JW** 2006 Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124:263-6
- Cooper JA** 2002 Actin dynamics: tropomyosin provides stability. *Curr Biol* 12:R523-5
- Cooper JA, Schafer DA** 2000 Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol* 12:97-103
- Cory GO, Garg R, Cramer R, Ridley AJ** 2002 Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *J Biol Chem* 277:45115-21
- Coso OA, Chiariello M, Yu JC, et al.** 1995 The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81:1137-46
- Dan C, Kelly A, Bernard O, Minden A** 2001 Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J Biol Chem* 276:32115-21
- Daniels RH, Zenke FT, Bokoch GM** 1999 alphaPix stimulates p21-activated kinase activity through exchange factor-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 274:6047-50
- Davison TS, Johnson CD, Andruss BF** 2006 Analyzing micro-RNA expression using microarrays. *Methods Enzymol* 411:14-34

Dawe HR, Minamide LS, Bamburg JR, Cramer LP 2003 ADF/cofilin controls cell polarity during fibroblast migration. *Curr Biol* 13:252-7

Delaisse JM, Engsig MT, Everts V, et al. 2000 Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta* 291:223-34

DesMarais V, Ichetovkin I, Condeelis J, Hitchcock-DeGregori SE 2002 Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge. *J Cell Sci* 115:4649-60

Destaing O, Saltel F, Geminard JC, Jurdic P, Bard F 2003 Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol Biol Cell* 14:407-16

Dharmawardhane S, Sanders LC, Martin SS, Daniels RH, Bokoch GM 1997 Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pinocytic vesicles and cortical actin structures in stimulated cells. *J Cell Biol* 138:1265-78

Diaz B, Barnard D, Filson A, MacDonald S, King A, Marshall M 1997 Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol Cell Biol* 17:4509-16

Dong R, Cwynarski K, Entwistle A, et al. 2003 Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood* 101:3560-7

dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, et al. 2003 Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 83:433-73

Du J, Frieden C 1998 Kinetic studies on the effect of yeast cofilin on yeast actin polymerization. *Biochemistry* 37:13276-84

Duong LT, Rodan GA 2000 PYK2 is an adhesion kinase in macrophages, localized in podosomes and activated by beta(2)-integrin ligation. *Cell Motil Cytoskeleton* 47:174-88

Dutartre H, Davoust J, Gorvel JP, Chavrier P 1996 Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J Cell Sci* 109 (Pt 2):367-77

Edmonds BT, Wyckoff J, Yeung YG, et al. 1996 Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. *J Cell Sci* 109 (Pt 11):2705-14

Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN 1999 Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1:253-9

Erickson HP 1989 Co-operativity in protein-protein association. The structure and stability of the actin filament. *J Mol Biol* 206:465-74

Eswaran J, Lee WH, Debreczeni JE, et al. 2007 Crystal Structures of the p21-activated kinases PAK4, PAK5, and PAK6 reveal catalytic domain plasticity of active group II PAKs. *Structure* 15:201-13

Eswaran J, Soundararajan M, Kumar R, Knapp S 2008 UnPAKing the class differences

among p21-activated kinases. *Trends Biochem Sci* 33:394-403

Etienne-Manneville S, Hall A 2002 Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-35

Evangelista M, Zigmond S, Boone C 2003 Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci* 116:2603-11

Evans JG, Correia I, Krasavina O, Watson N, Matsudaira P 2003 Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J Cell Biol* 161:697-705

Fabunmi RP, Sukhova GK, Sugiyama S, Libby P 1998 Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: a potential protective mechanism in plaque stability. *Circ Res* 83:270-8

Feng Q, Albeck JG, Cerione RA, Yang W 2002 Regulation of the Cool/Pix proteins: key binding partners of the Cdc42/Rac targets, the p21-activated kinases. *J Biol Chem* 277:5644-50

Feng Q, Baird D, Cerione RA 2004 Novel regulatory mechanisms for the Dbl family guanine nucleotide exchange factor Cool-2/ α -Pix. *Embo J* 23:3492-504

Fischer A 2001 Primary immunodeficiency diseases: an experimental model for molecular medicine. *Lancet* 357:1863-9

Flanders JA, Feng Q, Bagrodia S, Laux MT, Singavarapu A, Cerione RA 2003 The Cbl proteins are binding partners for the Cool/Pix family of p21-activated kinase-binding proteins. *FEBS Lett* 550:119-23

Fujibuchi T, Abe Y, Takeuchi T, et al. 2005 AIP1/WDR1 supports mitotic cell rounding. *Biochem Biophys Res Commun* 327:268-75

Fultz ME, Li C, Geng W, Wright GL 2000 Remodeling of the actin cytoskeleton in the contracting A7r5 smooth muscle cell. *J Muscle Res Cell Motil* 21:775-87

Gaidano G, Bergui L, Schena M, et al. 1990 Integrin distribution and cytoskeleton organization in normal and malignant monocytes. *Leukemia* 4:682-7

Gatti A, Huang Z, Tuazon PT, Traugh JA 1999 Multisite autophosphorylation of p21-activated protein kinase gamma-PAK as a function of activation. *J Biol Chem* 274:8022-8

Gavazzi I, Nermut MV, Marchisio PC 1989 Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *J Cell Sci* 94 (Pt 1):85-99

Gimona M, Buccione R, Courtneidge SA, Linder S 2008 Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr Opin Cell Biol* 20:235-41

Gimona M, Kaverina I, Resch GP, Vignat E, Burgstaller G 2003 Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 14:2482-91

Gnesutta N, Qu J, Minden A 2001 The serine/threonine kinase PAK4 prevents caspase activation and protects cells from apoptosis. *J Biol Chem* 276:14414-9

Gohla A, Birkenfeld J, Bokoch GM 2005 Chronophin, a novel HAD-type serine protein

phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat Cell Biol* 7:21-9

Gohla A, Bokoch GM 2002 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. *Curr Biol* 12:1704-10

Greenberg S, Grinstein S 2002 Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14:136-45

Gringel A, Walz D, Rosenberger G, et al. 2006 PAK4 and alphaPIX determine podosome size and number in macrophages through localized actin regulation. *J Cell Physiol* 209:568-79

Hai CM 2000 Mechanosensitive modulation of receptor-mediated crossbridge activation and cytoskeletal organization in airway smooth muscle. *Arch Pharm Res* 23:535-47

Hall A 1998 Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-14

Hannon GJ 2002 RNA interference. *Nature* 418:244-51

Hanson J, Lowy J 1964 The Structure of Actin Filaments and the Origin of the Axial Periodicity in the I-Substance of Vertebrate Striated Muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 160:449-60

Harris HE, Weeds AG 1984 Plasma gelsolin caps and severs actin filaments. *FEBS Lett* 177:184-8

Hartwig JH, Bokoch GM, Carpenter CL, et al. 1995 Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 82:643-53

Hawkins M, Pope B, Maciver SK, Weeds AG 1993 Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry* 32:9985-93

Hayden SM, Miller PS, Brauweiler A, Bamburg JR 1993 Analysis of the interactions of actin depolymerizing factor with G- and F-actin. *Biochemistry* 32:9994-10004

Hegyi L, Hardwick SJ, Siow RC, Skepper JN 2001 Macrophage death and the role of apoptosis in human atherosclerosis. *J Hematother Stem Cell Res* 10:27-42

Higgs HN, Pollard TD 1999 Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J Biol Chem* 274:32531-4

Hoefen RJ, Berk BC 2006 The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci* 119:1469-75

Hofman P 2005 DNA microarrays. *Nephron Physiol* 99:p85-9

Holm C, Rayala S, Jirstrom K, Stal O, Kumar R, Landberg G 2006 Association between Pak1 expression and subcellular localization and tamoxifen resistance in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 98:671-80

Howell BW, Cooper JA 1994 Csk suppression of Src involves movement of Csk to sites of Src activity. *Mol Cell Biol* 14:5402-11

Jaffe AB, Hall A 2005 Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247-69

- Jaffer ZM, Chernoff J** 2002 p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* 34:713-7
- Johnson-Leger C, Aurrand-Lions M, Imhof BA** 2000 The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci* 113 (Pt 6):921-33
- Jones GE** 2000 Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J Leukoc Biol* 68:593-602
- Jones GE, Zicha D, Dunn GA, Blundell M, Thrasher A** 2002 Restoration of podosomes and chemotaxis in Wiskott-Aldrich syndrome macrophages following induced expression of WASp. *Int J Biochem Cell Biol* 34:806-15
- Jones NP, Katan M** 2007 Role of phospholipase Cgamma1 in cell spreading requires association with a beta-Pix/GIT1-containing complex, leading to activation of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* 27:5790-805
- Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, Destaing O** 2006 Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* 85:195-202
- Kabsch W, Vandekerckhove J** 1992 Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21:49-76
- Kelly T, Mueller SC, Yeh Y, Chen WT** 1994 Invadopodia promote proteolysis of a wide variety of extracellular matrix proteins. *J Cell Physiol* 158:299-308
- Kerkhoff E** 2006 Cellular functions of the Spir actin-nucleation factors. *Trends Cell Biol* 16:477-83
- Killion JJ, Fidler IJ** 1994 Systemic targeting of liposome-encapsulated immunomodulators to macrophages for treatment of cancer metastasis. *Immunomethods* 4:273-9
- Kim S, Kim T, Lee D, Park SH, Kim H, Park D** 2000 Molecular cloning of neuronally expressed mouse betaPix isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 272:721-5
- Kim S, Lee SH, Park D** 2001 Leucine zipper-mediated homodimerization of the p21-activated kinase-interacting factor, beta Pix. Implication for a role in cytoskeletal reorganization. *J Biol Chem* 276:10581-4
- Kimura K, Ito M, Amano M, et al.** 1996 Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273:245-8
- King AJ, Sun H, Diaz B, et al.** 1998 The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396:180-3
- King CC, Gardiner EM, Zenke FT, et al.** 2000 p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). *J Biol Chem* 275:41201-9
- Koh CG, Manser E, Zhao ZS, Ng CP, Lim L** 2001 Beta1PIX, the PAK-interacting exchange factor, requires localization via a coiled-coil region to promote microvillus-like structures and membrane ruffles. *J Cell Sci* 114:4239-51
- Koh CG, Tan EJ, Manser E, Lim L** 2002 The p21-activated kinase PAK is negatively

regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatases of the PP2C family. *Curr Biol* 12:317-21

Kopp P, Lammers R, Aepfelbacher M, et al. 2006 The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Mol Biol Cell* 17:2811-23

Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L 1995 The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15:1942-52

Kuhn JR, Pollard TD 2005 Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys J* 88:1387-402

Kusano K, Abe H, Obinata T 1999 Detection of a sequence involved in actin-binding and phosphoinositide-binding in the N-terminal side of cofilin. *Mol Cell Biochem* 190:133-41

Kutsche K, Yntema H, Brandt A, et al. 2000 Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet* 26:247-50

Lamorte L, Park M 2003 ARF1 and ARF6 are dispensable for Crk-dependent epithelial-mesenchymal-like transitions. *Anticancer Res* 23:2085-92

Lee KH, Meuer SC, Samstag Y 2000 Cofilin: a missing link between T cell co-stimulation and rearrangement of the actin cytoskeleton. *Eur J Immunol* 30:892-9

Lehto VP, Hovi T, Vartio T, Badley RA, Virtanen I 1982 Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophages. *Lab Invest* 47:391-9

Lei M, Lu W, Meng W, et al. 2000 Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* 102:387-97

Li AH, Kong Y, Cho SH, et al. 2005 Molecular cloning and characterization of the copper/zinc and manganese superoxide dismutase genes from the human parasite *Clonorchis sinensis*. *Parasitology* 130:687-97

Lim L, Manser E, Leung T, Hall C 1996 Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways. *Eur J Biochem* 242:171-85

Lin L, Kurpakus Wheeler M 1999 Differential rapid adhesion of bovine ocular surface epithelial cells to laminin isoforms. *Curr Eye Res* 19:293-9

Linder S 2007 The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol* 17:107-17

Linder S, Aepfelbacher M 2003 Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol* 13:376-85

Linder S, Higgs H, Hufner K, Schwarz K, Pannicke U, Aepfelbacher M 2000 The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the Arp2/3 complex. *J Immunol* 165:221-5

Linder S, Hufner K, Wintergerst U, Aepfelbacher M 2000 Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J Cell Sci*

113 Pt 23:4165-76

Linder S, Kopp P 2005 Podosomes at a glance. *J Cell Sci* 118:2079-82

Linder S, Nelson D, Weiss M, Aepfelbacher M 1999 Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9648-53

Linder S, Wintergerst U, Bender-Gotze C, Schwarz K, Pannicke U, Aepfelbacher M 2003 Macrophages of patients with X-linked thrombocytopenia display an attenuated Wiskott-Aldrich syndrome phenotype. *Immunol Cell Biol* 81:130-6

Loo TH, Ng YW, Lim L, Manser E 2004 GIT1 activates p21-activated kinase through a mechanism independent of p21 binding. *Mol Cell Biol* 24:3849-59

Lorenz M, DesMarais V, Macaluso F, Singer RH, Condeelis J 2004 Measurement of barbed ends, actin polymerization, and motility in live carcinoma cells after growth factor stimulation. *Cell Motil Cytoskeleton* 57:207-17

Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD 1994 Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* 127:107-15

Maciver SK 1998 How ADF/cofilin depolymerizes actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* 10:140-4

Maciver SK, Hussey PJ 2002 The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol* 3:reviews3007

Maciver SK, Pope BJ, Whytock S, Weeds AG 1998 The effect of two actin depolymerizing factors (ADF/cofilins) on actin filament turnover: pH sensitivity of F-actin binding by human ADF, but not of *Acanthamoeba* actophorin. *Eur J Biochem* 256:388-97

Maciver SK, Weeds AG 1994 Actophorin preferentially binds monomeric ADP-actin over ATP-bound actin: consequences for cell locomotion. *FEBS Lett* 347:251-6

Manabe R, Kovalenko M, Webb DJ, Horwitz AR 2002 GIT1 functions in a motile, multi-molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. *J Cell Sci* 115:1497-510

Manser E, Chong C, Zhao ZS, et al. 1995 Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J Biol Chem* 270:25070-8

Manser E, Huang HY, Loo TH, et al. 1997 Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol* 17:1129-43

Manser E, Loo TH, Koh CG, et al. 1998 PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* 1:183-92

Marchisio PC, Bergui L, Corbascio GC, et al. 1988 Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood* 72:830-3

Marchisio PC, Cirillo D, Naldini L, Primavera MV, Teti A, Zambonin-Zallone A 1984 Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J Cell Biol* 99:1696-705

- Marchisio PC, Cirillo D, Teti A, Zambonin-Zallone A, Tarone G** 1987 Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Exp Cell Res* 169:202-14
- Martinet W, Schrijvers DM, Herman AG, De Meyer GR** 2006 z-VAD-fmk-induced non-apoptotic cell death of macrophages: possibilities and limitations for atherosclerotic plaque stabilization. *Autophagy* 2:312-4
- Matafora V, Paris S, Dariozzi S, de Curtis I** 2001 Molecular mechanisms regulating the subcellular localization of p95-APP1 between the endosomal recycling compartment and sites of actin organization at the cell surface. *J Cell Sci* 114:4509-20
- Mayhew MW, Webb DJ, Kovalenko M, Whitmore L, Fox JW, Horwitz AF** 2006 Identification of protein networks associated with the PAK1-betaPIX-GIT1-paxillin signaling complex by mass spectrometry. *J Proteome Res* 5:2417-23
- McGough A, Pope B, Chiu W, Weeds A** 1997 Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol* 138:771-81
- Meberg PJ, Ono S, Minamide LS, Takahashi M, Bamburg JR** 1998 Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil Cytoskeleton* 39:172-90
- Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M** 1995 Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81:1147-57
- Mizutani K, Miki H, He H, Maruta H, Takenawa T** 2002 Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res* 62:669-74
- Molteni R, Fabbri M, Bender JR, Pardi R** 2006 Pathophysiology of leukocyte-tissue interactions. *Curr Opin Cell Biol* 18:491-8
- Moreau V, Tatin F, Varon C, Genot E** 2003 Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol* 23:6809-22
- Moriyama K, Iida K, Yahara I** 1996 Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1:73-86
- Moriyama K, Yahara I** 2002 The actin-severing activity of cofilin is exerted by the interplay of three distinct sites on cofilin and essential for cell viability. *Biochem J* 365:147-55
- Morreale A, Venkatesan M, Mott HR, et al.** 2000 Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK. *Nat Struct Biol* 7:384-8
- Mott HR, Nietlispach D, Evetts KA, Owen D** 2005 Structural analysis of the SH3 domain of beta-PIX and its interaction with alpha-p21 activated kinase (PAK). *Biochemistry* 44:10977-83
- Muller WA** 2003 Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24:327-34

- Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD** 1998 The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6181-6
- Mullins RD, Kelleher JF, Xu J, Pollard TD** 1998 Arp2/3 complex from *Acanthamoeba* binds profilin and cross-links actin filaments. *Mol Biol Cell* 9:841-52
- Muto Y, Nagao T, Urushidani T** 1997 The putative phospholipase C inhibitor U73122 and its negative control, U73343, elicit unexpected effects on the rabbit parietal cell. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1379-88
- Nakamura N, Tanaka J, Sobue K** 1993 Rous sarcoma virus-transformed cells develop peculiar adhesive structures along the cell periphery. *J Cell Sci* 106 (Pt 4):1057-69
- Nakano K, Kanai-Azuma M, Kanai Y, et al.** 2003 Cofilin phosphorylation and actin polymerization by NRK/NESK, a member of the germinal center kinase family. *Exp Cell Res* 287:219-27
- Nayal A, Webb DJ, Brown CM, Schaefer EM, Vicente-Manzanares M, Horwitz AR** 2006 Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J Cell Biol* 173:587-9
- Neudauer CL, Joberty G, Tatsis N, Macara IG** 1998 Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10. *Curr Biol* 8:1151-60
- Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, Mizuno K, Uemura T** 2002 Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 108:233-46
- Nobes CD, Hall A** 1995 Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62
- Okada K, Obinata T, Abe H** 1999 XAIP1: a *Xenopus* homologue of yeast actin interacting protein 1 (AIP1), which induces disassembly of actin filaments cooperatively with ADF/cofilin family proteins. *J Cell Sci* 112 (Pt 10):1553-65
- Okada K, Ravi H, Smith EM, Goode BL** 2006 Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol Biol Cell* 17:2855-68
- Okada K, Takano-Ohmuro H, Obinata T, Abe H** 1996 Dephosphorylation of cofilin in polymorphonuclear leukocytes derived from peripheral blood. *Exp Cell Res* 227:116-22
- Olofsson B** 1999 Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* 11:545-54
- Ono S, Mohri K, Ono K** 2004 Microscopic evidence that actin-interacting protein 1 actively disassembles actin-depolymerizing factor/Cofilin-bound actin filaments. *J Biol Chem* 279:14207-12
- Ono S, Ono K** 2002 Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J Cell Biol* 156:1065-76
- Orr P, Hobgood A, Coberley S, et al.** 2006 Improvement of LDL-C laboratory values achieved by participation in a cardiac or diabetes disease management program. *Dis*

Manag 9:360-70

Ory S, Munari-Silem Y, Fort P, Jurdic P 2000 Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage-derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation. *J Cell Sci* 113 (Pt 7):1177-88

Osiak AE, Zenner G, Linder S 2005 Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res* 307:342-53

Pandey A, Dan I, Kristiansen TZ, et al. 2002 Cloning and characterization of PAK5, a novel member of mammalian p21-activated kinase-II subfamily that is predominantly expressed in brain. *Oncogene* 21:3939-48

Paris S, Longhi R, Santambrogio P, de Curtis I 2003 Leucine-zipper-mediated homo- and hetero-dimerization of GIT family p95-ARF GTPase-activating protein, PIX-, paxillin-interacting proteins 1 and 2. *Biochem J* 372:391-8

Paris S, Za L, Sporchia B, de Curtis I 2002 Analysis of the subcellular distribution of avian p95-APP2, an ARF-GAP orthologous to mammalian paxillin kinase linker. *Int J Biochem Cell Biol* 34:826-37

Park HS, Lee SH, Park D, et al. 2004 Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, beta Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H₂O₂. *Mol Cell Biol* 24:4384-94

Parrini MC, Lei M, Harrison SC, Mayer BJ 2002 Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol Cell* 9:73-83

Parrini MC, Matsuda M, de Gunzburg J 2005 Spatiotemporal regulation of the Pak1 kinase. *Biochem Soc Trans* 33:646-8

Petri B, Bixel MG 2006 Molecular events during leukocyte diapedesis. *Febs J* 273:4399-407

Pfaff M, Jurdic P 2001 Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin alphaVbeta3. *J Cell Sci* 114:2775-86

Platt N, da Silva RP, Gordon S 1998 Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 8:365-72

Poincloux R, Vincent C, Labrousse A, et al. 2006 Re-arrangements of podosome structures are observed when Hck is activated in myeloid cells. *Eur J Cell Biol* 85:327-32

Pollard TD 1986 Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol* 103:2747-54

Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD 2000 Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:545-76

Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD 2001 Actin dynamics. *J Cell Sci* 114:3-4

Pollard TD, Cooper JA 1984 Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* 23:6631-41

- Premont RT, Claing A, Vitale N, et al.** 1998 beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14082-7
- Premont RT, Claing A, Vitale N, Perry SJ, Lefkowitz RJ** 2000 The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing. *J Biol Chem* 275:22373-80
- Premont RT, Perry SJ, Schmalzigaug R, Roseman JT, Xing Y, Claing A** 2004 The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal* 16:1001-11
- Pring M, Evangelista M, Boone C, Yang C, Zigmond SH** 2003 Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* 42:486-96
- Puto LA, Pestonjamas K, King CC, Bokoch GM** 2003 p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. *J Biol Chem* 278:9388-93
- Qu J, Cammarano MS, Shi Q, Ha KC, de Lanerolle P, Minden A** 2001 Activated PAK4 regulates cell adhesion and anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* 21:3523-33
- Qu J, Li X, Novitsch BG, et al.** 2003 PAK4 kinase is essential for embryonic viability and for proper neuronal development. *Mol Cell Biol* 23:7122-33
- Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E, Mullins RD** 2005 Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* 433:382-8
- Raetz CR** 1993 Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J Bacteriol* 175:5745-53
- Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, et al.** 1999 Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 274:11924-9
- Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, et al.** 1999 Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation* 99:3103-9
- Rennefahrt UE, Deacon SW, Parker SA, et al.** 2007 Specificity profiling of Pak kinases allows identification of novel phosphorylation sites. *J Biol Chem* 282:15667-78
- Renoult C, Ternent D, Maciver SK, et al.** 1999 The identification of a second cofilin binding site on actin suggests a novel, intercalated arrangement of F-actin binding. *J Biol Chem* 274:28893-9
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A** 1992 The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70:401-10
- Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ** 2003 RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* 23:4219-29
- Rodal AA, Tetreault JW, Lappalainen P, Drubin DG, Amberg DC** 1999 Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments. *J Cell Biol* 145:1251-64
- Roig J, Traugh JA** 2001 Cytostatic p21 G protein-activated protein kinase gamma-PAK.

Vitam Horm 62:167-98

Rollins BJ 1996 Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 2:198-204

Rosenberger G, Jantke I, Gal A, Kutsche K 2003 Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrin-mediated signaling. *Hum Mol Genet* 12:155-67

Rosenberger G, Kutsche K 2006 AlphaPIX and betaPIX and their role in focal adhesion formation. *Eur J Cell Biol* 85:265-74

Rosok O, Pedeutour F, Ree AH, Aasheim HC 1999 Identification and characterization of TESK2, a novel member of the LIMK/TESK family of protein kinases, predominantly expressed in testis. *Genomics* 61:44-54

Rudel T, Bokoch GM 1997 Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276:1571-4

Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM, de Lanerolle P 1999 Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283:2083-5

Sato T, del Carmen Ovejero M, Hou P, et al. 1997 Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J Cell Sci* 110 (Pt 5):589-96

Schmalzigaug R, Garron ML, Roseman JT, et al. 2007 GIT1 utilizes a focal adhesion targeting-homology domain to bind paxillin. *Cell Signal* 19:1733-44

Schmidt A, Hall A 2002 Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587-609

Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Martinet W 2007 Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res* 73:470-80

Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W 2005 Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1256-61

Schurmann A, Mooney AF, Sanders LC, et al. 2000 p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol* 20:453-61

Schuuring E, Verhoeven E, Litvinov S, Michalides RJ 1993 The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Mol Cell Biol* 13:2891-98

Sells MA, Chernoff J 1997 Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family. *Trends Cell Biol* 7:162-7

Sells MA, Knaus UG, Bagrodia S, Ambrose DM, Bokoch GM, Chernoff J 1997 Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* 7:202-10

Shah PK, Falk E, Badimon JJ, et al. 1995 Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of

matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 92:1565-9

Soosairajah J, Maiti S, Wiggan O, et al. 2005 Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *Embo J* 24:473-86

Srinivasan S, Wang F, Glavas S, et al. 2003 Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P₃ and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* 160:375-85

Stockton R, Reutershan J, Scott D, Sanders J, Ley K, Schwartz MA 2007 Induction of vascular permeability: beta PIX and GIT1 scaffold the activation of extracellular signal-regulated kinase by PAK. *Mol Biol Cell* 18:2346-55

Stofega MR, Sanders LC, Gardiner EM, Bokoch GM 2004 Constitutive p21-activated kinase (PAK) activation in breast cancer cells as a result of mislocalization of PAK to focal adhesions. *Mol Biol Cell* 15:2965-77

Sun HQ, Yamamoto M, Mejillano M, Yin HL 1999 Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem* 274:33179-82

Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, et al. 2003 Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* 160:409-21

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T 2001 Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208

Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, et al. 1995 Possible involvement of focal adhesion kinase, p125FAK, in osteoclastic bone resorption. *J Cell Biochem* 58:424-35

Tang Y, Zhou H, Chen A, Pittman RN, Field J 2000 The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals. *J Biol Chem* 275:9106-9

Tao W, Pennica D, Xu L, Kalejta RF, Levine AJ 2001 Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev* 15:1796-807

Tarone G, Cirillo D, Giancotti FG, Comoglio PM, Marchisio PC 1985 Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res* 159:141-57

Tatin F, Varon C, Genot E, Moreau V 2006 A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *J Cell Sci* 119:769-81

Thai SF, Lewis JG, Williams RB, Johnson SP, Adams DO 1995 Effects of oxidized LDL on mononuclear phagocytes: inhibition of induction of four inflammatory cytokine gene RNAs, release of NO, and cytolysis of tumor cells. *J Leukoc Biol* 57:427-33

Theriot JA, Mitchison TJ 1991 Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* 352:126-31

Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH 2002 The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* 36:489-519

Toshima J, Toshima JY, Amano T, Yang N, Narumiya S, Mizuno K 2001 Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell* 12:1131-45

- Toshima J, Toshima JY, Takeuchi K, Mori R, Mizuno K** 2001 Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J Biol Chem* 276:31449-58
- Turner CE, Brown MC, Perrotta JA, et al.** 1999 Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol* 145:851-63
- Turner CE, West KA, Brown MC** 2001 Paxillin-ARF GAP signaling and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 13:593-9
- Tuschl T** 2001 RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem* 2:239-45
- Underhill DM, Ozinsky A** 2002 Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 14:103-10
- Underhill DM, Ozinsky A** 2002 Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20:825-52
- Vadlamudi RK, Adam L, Wang RA, et al.** 2000 Regulatable expression of p21-activated kinase-1 promotes anchorage-independent growth and abnormal organization of mitotic spindles in human epithelial breast cancer cells. *J Biol Chem* 275:36238-44
- Vadlamudi RK, Kumar R** 2003 P21-activated kinases in human cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22:385-93
- Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerckhove J, Ampe C** 2008 Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol* 87:649-67
- Vignjevic D, Yarar D, Welch MD, Peloquin J, Svitkina T, Borisy GG** 2003 Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J Cell Biol* 160:951-62
- Webb BA, Eves R, Crawley SW, Zhou S, Cote GP, Mak AS** 2005 PAK1 induces podosome formation in A7r5 vascular smooth muscle cells in a PAK-interacting exchange factor-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C898-907
- Wells CM, Abo A, Ridley AJ** 2002 PAK4 is activated via PI3K in HGF-stimulated epithelial cells. *J Cell Sci* 115:3947-56
- Westerberg L, Larsson M, Hardy SJ, Fernandez C, Thrasher AJ, Severinson E** 2005 Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Blood* 105:1144-52
- Worthylake RA, Burridge K** 2001 Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol* 13:569-77
- Wu C, Lee SF, Furmaniak-Kazmierczak E, Cote GP, Thomas DY, Leberer E** 1996 Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family. *J Biol Chem* 271:31787-90
- Wu WJ, Tu S, Cerione RA** 2003 Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation. *Cell* 114:715-25
- Yamaguchi H, Pixley F, Condeelis J** 2006 Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol* 85:213-8

- Yang F, Li X, Sharma M, Zarnegar M, Lim B, Sun Z** 2001 Androgen receptor specifically interacts with a novel p21-activated kinase, PAK6. *J Biol Chem* 276:15345-53
- Yang N, Higuchi O, Ohashi K, et al.** 1998 Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393:809-12
- Yonezawa N, Homma Y, Yahara I, Sakai H, Nishida E** 1991 A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin. *J Biol Chem* 266:17218-21
- Yonezawa N, Nishida E, Iida K, Yahara I, Sakai H** 1990 Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J Biol Chem* 265:8382-6
- Yonezawa N, Nishida E, Koyasu S, et al.** 1987 Distribution among tissues and intracellular localization of cofilin, a 21kDa actin-binding protein. *Cell Struct Funct* 12:443-52
- Yu JS, Chen WJ, Ni MH, Chan WH, Yang SD** 1998 Identification of the regulatory autophosphorylation site of autophosphorylation-dependent protein kinase (auto-kinase). Evidence that auto-kinase belongs to a member of the p21-activated kinase family. *Biochem J* 334 (Pt 1):121-31
- Zamboni-Zallone A, Teti A, Grano M, et al.** 1989 Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: a beta 3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp Cell Res* 182:645-52
- Zebda N, Bernard O, Bailly M, Welti S, Lawrence DS, Condeelis JS** 2000 Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. *J Cell Biol* 151:1119-28
- Zenke FT, King CC, Bohl BP, Bokoch GM** 1999 Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity. *J Biol Chem* 274:32565-73
- Zhan Q, Bamburg JR, Badwey JA** 2003 Products of phosphoinositide specific phospholipase C can trigger dephosphorylation of cofilin in chemoattractant stimulated neutrophils. *Cell Motil Cytoskeleton* 54:1-15
- Zhan Q, Ge Q, Ohira T, Van Dyke T, Badwey JA** 2003 p21-activated kinase 2 in neutrophils can be regulated by phosphorylation at multiple sites and by a variety of protein phosphatases. *J Immunol* 171:3785-93
- Zhao L, Ma QL, Calon F, et al.** 2006 Role of p21-activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease. *Nat Neurosci* 9:234-42
- Zhao ZS, Manser E, Chen XQ, Chong C, Leung T, Lim L** 1998 A conserved negative regulatory region in alphaPAK: inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* 18:2153-63
- Zhao ZS, Manser E, Loo TH, Lim L** 2000 Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* 20:6354-63
- Zigmond SH** 1996 Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol* 8:66-73

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die durch ihre Unterstützung und Anregungen, aber auch durch ihr Verständnis und ihre Geduld diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Herrn **Prof. Dr. P.C. Weber** danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut und das stete Interesse an meiner Arbeit.

Bei Herrn **Prof. Dr. Dr. J. Heesemann** möchte ich mich in zweierlei Hinsicht bedanken: einmal für die Nutzung der technischen Ausrüstung (v.a. des Konfokalmikroskops) des Max-von-Pettenkofer-Institutes, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Zum anderen für die Aufnahme in das Programm zur Förderung von Forschung und Lehre (FöFoLe) und die damit verbundenen finanzielle Unterstützung und die wissenschaftliche Weiterbildung.

Ich danke unseren Kooperationspartnern PD Dr. Kerstin Kutsche, Dr. Georg Rosenberger, Dr. Pankaj Goyal und Dr. Audrey Minden, die mir Antikörper und Konstrukte zur Verfügung gestellt haben. Vor allem möchte ich hier aber Dr. Georg Rosenberger danken für seine Klonierungskünste.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten sowie des Max-von-Pettenkofer Institutes danke ich für ihre gute Zusammenarbeit.

Meinen „pavillonischen“ Mit-Doktorandinnen und Doktoranden **Barbara, Petra, Anna, Daniel, Florian, Vanessa, Susanne und Christiane** möchte ich danken für die grandiose Hilfsbereitschaft, das äußerst angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima und den vielen Spaß den wir hatten.

Und nun zu den zwei Personen, denen ich am meisten für meine Doktorarbeit zu verdanken habe und die mir stets mit Rat und Tat zu Seite standen:

Frau **Barbara Böhlig** für ihren unermüdlichen Einsatz bei Monozytenisolationen, Proteinpräparationen und vielen anderen Dingen. Und für ihre moralische Unterstützung, wenn es mal nicht so lief wie ich es mir wünschte.

Herrn **PD Dr. Stefan Linder** für die beste Betreuung die man sich nur wünschen kann: für ständige Ansprechbarkeit, tatkräftige Hilfe, Geduld, neue Denkanstösse und die vielen netten Gespräche.

Zum Schluß möchte ich noch **meiner Familie und meinem Freund Andi** danken, die mich während meines Studiums und der Doktorarbeit immer wieder motiviert und unterstützt haben.

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Alexandra Gringel

Ottilienstraße 58

81827 München

089-41876633

0179-3265395

Alexandra.Gringel@web.de

Geboren am: 24.Mai 1981 in München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

STUDIUM UND SCHULBILDUNG

April 2001 – Oktober 2007: **Studium der Humanmedizin
Ludwig-Maximilians-Universität, München**
März 2003: Ärztliche Vorprüfung
Oktober 2007: Ärztliche Prüfung und Approbation

September 1991 – Juli 2000: **Städt. Heinrich-Heine-Gymnasium, München**
Mai 2000: Allgemeine Hochschulreife

September 1987 – Juli 1991: **Grundschule am Stehleranger, München**

PROMOTION

Seit April 2004: **Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der
Kreislaufkrankheiten der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**
Arbeitsgruppe PD Dr. Stefan Linder
Thema: „Regulation podosomaler Adhäsionen in primären
humanen Makrophagen durch p21-activated kinase (PAK)
- abhängige Signalwege“

Dezember 2004 – Mai 2006: **Promotionsstudium „Molekulare Medizin“**
Förderprogramm für Forschung und Lehre der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

November 2006: **Publikation im Journal of Cellular Physiology**
Gringel, A. et al. (2006) PAK4 and α -PIX determine
podosome size and number in macrophages through
localized actin regulation.
J Cell Physiol. 2006 Nov; 209(2):568-79.

PRAKTISCHES JAHR

Februar 2006 – Juni 2006:	Klinikum Neuperlach Innere Medizin (Kardiologie, interne Notaufnahme, Radiologie)
Juni 2006 – Oktober 2006:	Krankenhaus Agatharied Anästhesie und Intensivmedizin
Oktober 2006 – Januar 2007:	Klinikum Neuperlach Chirurgie (Gefäßchirurgie, Abdominalchirurgie, Unfallchirurgie, chirurgische Notaufnahme, anästhesiologische Intensivstation)

**FAMULATUREN UND
PFLEGEPRAKTIKUM**

September 2005:	Famulatur in der Inneren Medizin Praxis Dr. Strohmeier, München
September 2004:	Famulatur in der Anästhesie Praxisklinik Bayreuth
März 2004:	Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe Städt. Krankenhaus München-Neuperlach
Juli 2003:	Famulatur in der Inneren Medizin Kreisklinik Perlach, München
Oktober 2000 – Dezember 2000:	Pflegepraktikum in der Anästhesie Alpha-Klinik, München

NEBENTÄTIGKEITEN

März 2007 – April 2008:	Aushilfe Anästhesie AirportClinic, München
Februar 2005 – Juli 2006:	Studentische Hilfskraft Institut für Kreislaufkrankheiten der LMU
Januar 2001 – Dezember 2004:	Aushilfe Anästhesie-Aufwachraum Alphaklinik München